



**Daniela João Tavares Carvalho**

Licenciatura em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

## **Optimização da produção biológica de polihidroxialcanoatos por aplicação de processos de separação com membranas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientadoras: Doutora Carla Portugal, Investigador Auxiliar, REQUIMTE –  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa  
Doutora Catarina Oliveira, Investigador Pós-Doc,  
REQUIMTE – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade  
Nova de Lisboa

Júri

Presidente: Professora Doutora Maria A. M. Reis

Arguente: Professora Doutora Luísa Serafim

Vogal: Doutora Carla Portugal



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2014**



**Daniela João Tavares Carvalho**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Optimização da produção biológica de  
polihidroxialcanoatos por aplicação de processos de  
separação com membranas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Carla Portugal, Investigador Auxiliar, REQUIMTE -  
FCT/UNL

Doutora Catarina Oliveira, Investigador Pós-Doc, REQUIMTE -  
FCT/UNL

**Março 2014**



**Optimização da produção biológica de polihidroxialcanoatos por aplicação de processos de separação com membranas**

Copyright © Daniela João Tavares Carvalho, FCT-UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limitações geográficas, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Hardships often prepare ordinary people  
for an extraordinary destiny...”*

*C.S.Lewis*





# AGRADECIMENTOS

É com bastante orgulho que termino mais uma fase da minha vida académica. E como tal, não posso deixar de agradecer a um grande número de pessoas que contribuiu, directamente ou indirectamente, para a alcance desta etapa.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Doutora Carla Portugal e Doutora Catarina Oliveira, pela oportunidade de desenvolver a dissertação sob as suas orientações. Ambas foram um precioso apoio ao longo das diversas fases do desenvolvimento da presente dissertação, por todo o conhecimento, motivação, suporte e disponibilidade evidenciada em momentos vividos com maior dificuldade, apontando me sempre na direcção certa.

Em segundo lugar, a todas as pessoas que compõem o grupo BPEG, por me terem recebido de forma tão acolhedora, por todo o apoio e contínua disponibilidade. Um especial agradecimento à Inês Meireles por todo o conhecimento e apoio, em especial na fase inicial da dissertação. À Ana Rosa, Cláudia, Marisa, Rute, Rita, Diana e Jorge por todo o apoio, conhecimentos, integração e amizade ao longo desta etapa.

Aos meus amigos e colegas por todo o incentivo, pelas palavras de motivação e paciência nos momentos de maior ansiedade. Agradeço ainda por todos os bons momentos, de descontração e cumplicidade fundamentais nesta fase. Um especial agradecimento ao Zé Miguel, Gustavo, Jorge, Diogo, Rui, Gonçalo, Pedro, Tiago, Raquel, Andreia e Sayda.

Finalmente, mas de forma alguma com menor importância, fica o meu eterno agradecimento e gratidão à minha Mãe, Tia e às minhas primas Cristiana e Adriana. Por todo o apoio incondicional, não só nesta fase, mas em toda a vida. Pela sua enorme força e ânimo nos momentos mais difíceis, pela amizade, compreensão, entusiasmo e carinho em tudo o percurso. Um muito obrigado pelos valores e confiança transmitida, fazem de mim a pessoa que sou hoje.



# RESUMO

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são plásticos biodegradáveis produzidos por uma grande variedade de microorganismos a partir de fontes renováveis. Actualmente, os PHA são produzidos de forma eficiente através de matérias-primas quimicamente definidas, fermentadas por culturas puras. No entanto, a implementação da produção tem sido limitada devido aos elevados custos desta, em comparação com plásticos convencionais. As culturas microbianas mistas surgem como uma alternativa, usando subprodutos industriais e sem necessidade de condições de esterilização. Contudo, a produção de PHA através de culturas mistas necessita de optimização.

O estudo descrito nesta dissertação teve como objectivo estudar o impacto da redução do teor proteico na primeira etapa da produção de PHA por culturas mistas, a fermentação acidogénica. A matéria-prima utilizada foi o soro de leite, uma matéria-prima de elevado teor proteico. Ao longo do trabalho foram produzidos diferentes fracções de soro de leite em composição e topologia. A recuperação de uma fracção do soro de leite tem como objectivo produzir um produto adicional de valor acrescentado ao processo de produção de PHA. A redução do teor proteico tem como objectivo a recuperação de um teor proteico de modo a produzir um produto de valor acrescentado na produção de PHA.

Inicialmente foi abordada a aplicação de processos de separação com membranas. A utilização de processo de ultrafiltração com diferentes limites de exclusão molecular, de modo a produzir fracções com teor e tipologia de proteínas diferentes. A concentração de lactose e sais não foi alterada pela aplicação do processo. O primeiro permeado continha péptidos e aminoácidos, o segundo além desta por  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG (as proteínas em maior quantidade no soro de leite), e um terceiro com toda a tipologia do soro de leite. O fluxo de permeado foi tanto mais prejudicado quanto maior foi o limite de exclusão molecular da membrana utilizada. A utilização dos processos dia-ultrafiltração com uma membrana de 30kDa e osmose inversa possibilitou a concentração de 3,5 vezes em relação ao processo de ultrafiltração com a mesma membrana. O permeado obtido era maioritariamente composto por aminoácidos, péptidos e as proteínas de menor tamanho do soro de leite ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG).

A utilização do permeado obtido no processo de dia-ultrafiltração e osmose, com 60% do teor proteico do soro de leite, foi suficiente para igualar a produção de ácidos gordos voláteis (VFA) e crescimento celular do reactor de referência efectuado com soro de leite não fraccionado. Além disso, o rendimento de crescimento, o rendimento de produção de VFA e os perfis de VFA não foram alterados.

Pode-se concluir que o processo de dia-ultrafiltração permitiu recuperar 40% das proteínas presentes no soro de leite sem comprometer a produção de VFA (percursores de PHAs) pelo processo de fermentação acidogénica. Deste modo, será possível aumentar a rentabilidade económica do processo, sem prejudicar a produção biológica de PHA.

**Palavras-chave:** Ultrafiltração; colmatação da membrana; fermentação acidogénica; VFA; soro e leite; culturas microbianas mistas;



# ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable plastics produced by a wide variety of microorganisms from renewable sources. Currently, PHAs are efficiently produced using raw materials chemically defined, fermented by pure cultures. Therefore, the implementation of production has been limited due to its high costs, compared to conventional plastics. The mixed microbial cultures emerge as an alternative, using industry byproducts and without requiring sterilization conditions. However, PHA production by mixed cultures requires optimization.

This study aimed at assessing the impact that the reducing of the protein content would have on the first stage of the production of PHA, the acidogenic fermentation. The raw material used was whey which has high protein content. Throughout the work different whey fractions were produced. They differentiated in composition and topology. The recovery of a fraction of whey intended to produce an additional value-added product of the PHA production process. A raw material with a low protein content and different type of whey is supplied to the system in order to obtain an additional value-added product of the process.

The reduction in the protein content is aimed at recovering one specific protein content in order to produce a value-added product for the production of PHA. Initially the application of membrane separation processes was studied. The use of ultrafiltration process, with different molecular exclusion limits, intended to produce fractions with different content and type of proteins. The concentration of lactose and salts was not altered by the application of the process. The first permeate contained peptides and amino acids, the second beyond this,  $\alpha$  - LA and  $\beta$  -LG (proteins in larger quantities in whey), and a third with every type of whey. The permeate flux was much more affected as much greater was the molecular exclusion limit of the membrane used. The use of dia ultrafiltration processes with a 30kDa membrane and reverse osmosis allowed a concentration 3,5 times superior compared to ultrafiltration process with the same membrane. The permeate obtained was mainly composed of amino acids, peptides and smaller proteins from whey ( $\alpha$  - LA and  $\beta$  -LG)

The use of the obtained permeate at dia-ultrafiltration and osmosis process, with 60% of the protein content of the whey was sufficient to match the production of volatile fatty acids (VFA) and cell growth reactor made with whey unfractionated. Moreover, the growth yield, the yield of produced fermented products and profiles of fermented products did not change.

It can be concluded that the process of dia-ultrafiltration allowed the recover 40% of the proteins present in whey without compromising VFA production (PHA precursors) by acidogenic fermentation process. Therefore, it is possible to increase the economic viability of the process without harming the biological production of PHA.

**Keywords:** Ultrafiltration; fouling; acidogenic fermentation, VFA, whey, mixed microbial cultures



# ÍNDICE

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>vii</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>xix</b>
<b>Lista de símbolos .....</b>	<b>xxi</b>
<b>1. Motivação, objectivos e estrutura .....</b>	<b>1</b>
1.1. Motivação e objectivos do trabalho .....	3
1.2. Estrutura .....	3
<b>2. Introdução .....</b>	<b>5</b>
2.1. Produção de polihidroxialcanoatos por uma cultura microbianas mistas .....	7
2.1.1 . Polihidroxialcanoatos: estrutura química, propriedades e aplicação. ....	7
2.1.2 . Biossíntese por cultura microbiana mista .....	8
2.2. Soro de leite .....	10
2.3. Processos de separação com membranas .....	12
2.4. Ponto de situação do estudo .....	15
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>17</b>
3.1 . Processos de separação com membranas .....	19
3.1.1 Montagem experimental .....	20
3.1.2 Compactação da membrana .....	21
3.1.3 Procedimento de limpeza da membrana .....	22
3.1.4 Ensaio de dia-ultrafiltração .....	22
3.2 . Fermentação acidogénica .....	22
3.2.1 Inóculo .....	22
3.2.2 Meio de cultura .....	23
3.2.3 Procedimento experimental .....	23
3.3 Cálculos .....	24
3.3.1 Processos de separação com membranas .....	24
3.3.1 Fermentação acidogénica .....	26
3.4 Métodos Analíticos .....	27
<b>4. Resultados e discussão .....</b>	<b>29</b>

4.1	Fraccionamento do conteúdo proteico do soro de leite por aplicação de processos com membranas .....	31
4.1.1	Ensaio realizado a pressão transmembranar constante .....	33
4.1.2	Ensaio realizado numa gama de pressões transmembranar .....	37
4.1.3	Ensaio realizado abaixo da pressão transmembranar crítica .....	42
4.1.4	Produção de um permeado com elevador teor proteico e composição em $\alpha$ -LA e $\beta$ -LG .....	43
4.2	Fermentação acidogénica .....	47
4.2.1	Fermentação acidogénica: soro de leite bruto .....	47
4.2.2	Fermentação acidogénica: soro de leite fraccionado.....	52
<b>5.</b>	<b>Conclusão e trabalhos futuros .....</b>	<b>65</b>
5.1	Conclusão.....	67
5.2	Trabalhos futuros.....	69
	<b>Bibliografia.....</b>	<b>71</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Estrutura de monómeros de PHA com short-chain length (scl-PHA) e medium-chain-length (mcl-PHA). Adaptado de [17].....	8
<b>Figura 2.2.</b> Esquema do processo usual de produção de PHA. Adaptado de [18].....	9
<b>Figura 2.3.</b> Esquema do processo de produção de PHA com a integração do processo de ultrafiltração. ....	15
<b>Figura 3.1.</b> Fluxograma das actividades experimentais realizadas. ....	19
<b>Figura 3.2</b> Esquema do sistema dead-end do processo de ultrafiltração. Adaptado [54] .....	20
<b>Figura 3.3.</b> Frascos de soro antes de realizar <i>flush</i> (a) e depois (b).....	24
<b>Figura 4.1.</b> Concentração de lactose e condutividade da alimentação, permeados e retidos, ao longo do tempo para o ensaio com a membrana de 5kDa (ensaio UF3). ( □ e ○ representam os valores de condutividade e concentração de lactose do soro de leite inicial, utilizado como alimentação do processo UF). ....	33
<b>Figura 4.2.</b> Fluxo de permeado ao longo do tempo nos ensaios com membrana de 5kDa (UF1), 30kDa (UF8) e 100kDa (UF9), realizados a pressão transmembranar constante. (o fluxo em t=0min foi determinado apenas com água desionizada). ....	34
<b>Figura 4.3.</b> Gel de SDS-PAGE do ensaio com membrana 5kDa (UF1). P Amostras padrão; 1: soro de leite não fraccionado; 2- retido no final do ensaio; 3-7: permeados obtidos ao longo do tempo;.....	35
<b>Figura 4.4.</b> Gel de SDS-PAGE do ensaio com membrana 30kDa (UF8). P Amostras padrão; 1: soro de leite não fraccionado; 2-8: permeados obtidos ao longo do tempo; 9: retido no final do ensaio. (1 é referente à $\alpha$ -LA e 2 à $\beta$ -LG). ....	36
<b>Figura 4.5.</b> Gel de SDS-PAGE do ensaio com membrana 100kDa (UF9). P Amostras padrão; 1: soro de leite não fraccionado; 2-5: permeados obtidos ao longo do tempo; 6: retido no final do ensaio. (1 é referente à $\alpha$ -LA, 2 à $\beta$ -LG, 3 à NI, 4 à BSA e 5 a IG). ....	36
<b>Figura 4.6.</b> Fluxo de permeado e permeabilidade hidráulica do ensaio com membrana 5kDa em função da pressão transmembranar aplicada (UF3). ....	38
<b>Figura 4.7.</b> Fluxo de permeado e permeabilidade hidráulica do ensaio com membrana 10kDa em função da pressão transmembranar aplicada (UF5). ....	38
<b>Figura 4.8.</b> Fluxo de permeado e permeabilidade hidráulica do ensaio com membrana 30kDa em função da pressão transmembranar aplicada (UF6). ....	39
<b>Figura 4.9.</b> Fluxo de permeado em função de uma gama de pressão transmembranar aplicada com membrana 5kDa (UF3) (— representa a pressão transmembranar). ....	40
<b>Figura 4.10.</b> Fluxo de permeado em função de uma gama de pressão transmembranar aplicada com membrana 10kDa (UF5) (— representa a pressão transmembranar). ....	40
<b>Figura 4.11.</b> Fluxo de permeado em função de uma gama de pressão transmembranar aplicada com membrana 30kDa (UF6) (— representa a pressão transmembranar). ....	41

<b>Figura 4.12.</b> Fluxo de permeado e teor proteico ao longo do tempo no ensaio com membrana de 30kDa (UF7), realizado a pressão transmembranar constante. (o fluxo em t=0min foi determinado apenas com água desionizada). .....	43
<b>Figura 4.13.</b> Fluxo de permeado ao longo do tempo, à pressão transmembranar de 0,6 bar no ensaio dia-ultrafiltração (DUF) com membrana de 30 kDa. (o fluxo em t=0min foi determinado apenas com água desionizada). .....	45
<b>Figura 4.14.</b> Produção de VFA nos reactores A.0, B.0 e C.0. ....	48
<b>Figura 4.15.</b> Consumo de lactose nos reactores A.0, B.0 e C.0. ....	48
<b>Figura 4.16.</b> Perfil de ácidos gordos produzidos no final de 30 horas nos ensaios (a) A.0, (b) B.0 e (c) C.0 (percentagem em base mássica). .....	51
<b>Figura 4.17.</b> Consumo de lactose no conjunto de ensaios A (A.0 A.1, A.2, A.3 e A.4). ....	54
<b>Figura 4.18.</b> Produção de VFA conjunto de ensaios A (A.0 A.1, A.2, A.3 e A.4).....	54
<b>Figura 4.19.</b> Crescimento da Biomassa em função do teor proteico fornecido no conjunto de ensaios A. (○ representa o reactor com soro de leite bruto). .....	55
<b>Figura 4.20.</b> Rendimento de produção de VFA e rendimento de crescimento no final de 30h, em função do teor proteico fornecido no conjunto de ensaios A. (Δ e ○ representam o reactor com soro de leite bruto). .....	55
<b>Figura 4.21.</b> Perfis de ácidos gordos produzidos ao final de 30 horas nos ensaios (a) A.0, (b) A.1 e (c) A.2, (c) A.3 e (d) A.4. ....	56
<b>Figura 4.22.</b> Consumo de lactose nos conjuntos de ensaios B e C ao final de 30 horas. ....	57
<b>Figura 4.23.</b> Produção de VFA nos conjuntos de ensaios B e C ao final de 30 horas. ....	58
<b>Figura 4.24.</b> Crescimento da Biomassa em função do teor proteico fornecido nos conjuntos de ensaios B e C. (Δ e ○ representa o reactor com soro de leite bruto). ....	59
<b>Figura 4.25.</b> Rendimento de produção de VFA e rendimento de crescimento para t=30h do conjunto de ensaios B. (Δ e ○ representam o reactor com soro de leite bruto). .....	59
<b>Figura 4.26.</b> Perfis dos ácidos gordos produzidos no final de 30 horas nos ensaios (a) B.0, (b) B.1, (c) B.2, (d) B.3, (e) C.0 e (f) C.1.....	60
<b>Figura 4.27.</b> Normalização do rendimento de crescimento em função da razão lactose/proteína, nos conjuntos de ensaio A, B e C. (normalização em relação ao reactor de referência) .....	62
<b>Figura 4.28.</b> Normalização do rendimento de produção de VFA em função da razão lactose/proteína, nos conjuntos de ensaio A, B e C. (normalização em relação ao reactor de referência) .....	62
<b>Figura 4.29.</b> Consumo percentual (base mássica) do tipo de proteína no final de 6 horas nos reactores (a) B.0, (b) C.0, (d) B.1, (d) B.2, (e) B.3 e (f) C.1. ....	63

# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Composição do soro de leite. ....	10
<b>Tabela 2.2.</b> Características físicas das principais proteínas do soro de leite bovino. Adaptado [31].....	11
<b>Tabela 3.1.</b> Características das membranas usadas nos processos de separação com membranas.....	20
<b>Tabela 3.2.</b> Condições de pressão transmembranar (TMP) usados nos ensaios de ultrafiltração. ....	21
<b>Tabela 3.3.</b> Caracterização do soro de leite segundo a Lactogal. ....	21
<b>Tabela 4.1.</b> Condições de operação dos ensaios de ultrafiltração (tamanho do limite de exclusão molecular da membrana e pressão transmembranar usada).....	31
<b>Tabela 4.2.</b> Permeabilidade hidráulica inicial ( $L_{pi}$ ), antes ( $L_{pf1}$ ) e após ( $L_{pf2}$ ) a limpeza com membrana de 5kDa (UF1), 30kDa (UF8) e 100kDa (UF9). ....	35
<b>Tabela 4.3.</b> Rejeição aparente, coeficiente de permeabilidade do soluto total e individual, nos ensaios com membranas de 5kDa, 30kDa e 100kDa (UF1, UF8 e UF9 respectivamente). ....	37
<b>Tabela 4.4.</b> Concentração de $\beta$ – LG e $\alpha$ – LA em função da pressão transmembranar aplicada para a membrana de 30 kDa (UF6). ....	41
<b>Tabela 4.5.</b> Permeabilidade hidráulica inicial, antes e após a limpeza, nos ensaios com a membrana 5kDa (UF3), 10kDa (UF5) e 30kDa (UF6). ....	42
<b>Tabela 4.6.</b> Permeabilidade hidráulica inicial, antes e após a limpeza, no ensaio com membrana de 30 kDa (UF7).....	43
<b>Tabela 4.7.</b> Rejeição aparente, coeficiente de permeabilidade do soluto total e individual, nos ensaios com membrana 30kDa à pressão de 0,3bar UF7 e de 0,6bar (UF8). ....	43
<b>Tabela 4.8.</b> Permeabilidade hidráulica inicial e após a limpeza, no ensaio com membrana de 30 kDa no ensaio de dia-ultrafiltração. ....	45
<b>Tabela 4.9.</b> Condições iniciais em VSS, lactose e proteína dos ensaios A.0, B.0 e C.0. ....	47
<b>Tabela 4.10.</b> Crescimento da biomassa ( $\Delta X$ ), rendimento de produção de VFA ( $Y_{VFA/lactose}$ ) e biomassa ( $Y_{X/lactose}$ ) em relação à lactose consumida nos reactores A.0, B.0 e C.0. ....	49
<b>Tabela 4.11.</b> Velocidades específicas de consumo de proteína ( $-q_{prot}$ ) e lactose ( $-q_{lactose}$ ) e velocidade de produção de VFA ( $q_{VFA}$ ) nos ensaios A.0, B.0 e C.0. ....	50
<b>Tabela 4.12.</b> Consumo de proteínas no final das 30 horas do processo nos ensaios A.0, B.0 e C.0. ....	51
<b>Tabela 4.13.</b> Composição da alimentação inicial (lactose, teor proteico e percentagem relativa de cada proteína (base mássica)) utilizada em cada ensaio. ....	53
<b>Tabela 4.14.</b> Consumo de proteínas no final das 30 horas do processo nos ensaios A.1, A.2, A.3 e A.4. ....	56

<b>Tabela 4.15.</b> Rendimento de produção de VFA e rendimento de crescimento para t=30h do conjunto de ensaios C. ....	60
<b>Tabela 4.16.</b> Consumo de proteínas no final das 30 horas do processo nos ensaios B.1, B.2, B.3 e C.1.....	61
<b>Tabela 4.17.</b> Percentagem de consumo do tipo de proteína nos ensaios B.0, B.1, B.2 e B.3, ao final de 30 horas. ....	64

# LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina de soro de leite
CMM	Cultura microbiana mista
CBO	Carência bioquímica de oxigênio
ff	Carência química de oxigênio
DUF	Dia-ultrafiltração
FF	Fome e fartura
GP	Glicomacropéptido
Hact	Ácido acético
Hbut	Ácido butírico
HLac	Ácido láctico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Hprop	Ácido propionato
Hval	Ácido valérico
IGG	Imunoglobulina
LF	Lactoferrina
LI	Lisozima
LP	Lactoperoxidase
MBR	Bioreactor membranar
mcl-PHA	<i>Medium chain length</i> Polihidroxialcanoatos
MWCO	Limite de exclusão molecular (kDa)
NI	Proteína não identificada no soro de leite (40-48kDa)
PHA	Polihidroxialcanoatos
SBR	Sequencial batch reactor
scl-PHA	<i>Short chain length</i> Polihidroxialcanoatos
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio, electroforese em gel de poliacrilamida
UF	Ultrafiltração
$\alpha$ -LA	$\alpha$ -lactoalbumina
$\beta$ -LG	$\beta$ -lactoglobulina



# LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu$	Viscosidade da água (Pa.s).
A	Área da membrana (M2)
Cf	Concentração do permeado (g.L <sup>-1</sup> )
Cp	Concentração da alimentação (g.L <sup>-1</sup> )
J	Fluxo volumétrico (dm <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> ),
Jp	Fluxo volumétrico do soro de soluto (dm <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )
Jv	Fluxo volumétrico de solvente (dm <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> ),
Lp	Permeabilidade hidráulica da membrana (dm <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> .bar <sup>-1</sup> ),
Lp1	Permeabilidade hidráulica da membrana antes da limpeza (dm <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> .bar <sup>-1</sup> )
Lp2	Permeabilidade hidráulica da membrana após a limpeza (dm <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> .bar <sup>-1</sup> ),
Lpi	Permeabilidade hidráulica da membrana inicial (dm <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> .bar <sup>-1</sup> ),
Q	Caudal de permeado (dm <sup>3</sup> .h <sup>-1</sup> )
-q <sub>lactose</sub>	Velocidade específica de consumo de lactose (g <sub>lactose</sub> .g <sup>-1</sup> X.h <sup>-1</sup> )
-q <sub>prot</sub>	Velocidade específica de consumo de proteína (g <sub>proteína</sub> .g <sup>-1</sup> X.h <sup>-1</sup> )
q <sub>VFA</sub>	Velocidade de produção de VFA (g <sub>VFA</sub> .g <sup>-1</sup> X.h <sup>-1</sup> )
R <sub>a</sub>	Coeficiente de rejeição aparente (% base mássica)
S	Coeficiente de permeabilidade do soluto (g.g <sup>-1</sup> )
X	Biomassa
Y <sub>VFA/Lactose</sub>	Rendimento de produção de VFA (g <sub>VFA</sub> .g <sup>-1</sup> <sub>lactose</sub> )
Y <sub>x/lactose</sub>	Rendimento de crescimento (g <sub>x</sub> .g <sup>-1</sup> <sub>lactose</sub> )
TMP	Diferença de pressão hidrostática ou pressão transmembranar (bar)
$\Delta t$	Intervalo de tempo (min ou horas)
$\Delta X$	Crescimento da biomassa (% base mássica)
$\Delta \pi$	Diferença da pressão osmótica (bar)
VFA	Ácidos gordos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )
VSS	Sólidos suspensos voláteis (g.L <sup>-1</sup> )





---

## **1.MOTIVAÇÃO, OBJECTIVOS E ESTRUTURA**



## **1.1. Motivação e objectivos do trabalho**

A procura de alternativas para substituir os plásticos convencionais tem vindo a aumentar, devido aos seus problemas ambientais e instabilidade económica.

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são plásticos biodegradáveis produzidos por uma grande variedade de microrganismos a partir de fontes renováveis e são considerados bons candidatos na categoria de plásticos biodegradáveis. No entanto, a implementação da sua produção tem sido limitada devido aos elevados custos de produção, em comparação com plásticos convencionais, derivados do petróleo. A diferença de custos associados a produção de PHA por culturas puras é devido aos elevados custos da fonte de carbono e da manutenção do processo. A solução para o decréscimo dos custos da produção de PHA passa pela substituição das fontes de carbono refinadas por matérias-primas que sejam resíduos, ou matérias-primas mais económicas, e a substituição de culturas puras por uma cultura microbiana mista.

Verifica-se que na primeira etapa da produção de PHA por culturas mistas (fermentação acidogénica), quando o soro de leite é usado como matéria-prima, há uma componente do teor proteico do soro de leite, que não é consumido. Existe assim a possibilidade de recupera-lo e produzir um produto adicional à produção de PHA, de valor acrescentado devido ao elevado valor nutricional, funcional e de grande interesse na indústria farmacêutica.

De modo a conseguir um fraccionamento controlado dos componentes do soro de leite foram aplicados processos de separação com membranas, nomeadamente a ultrafiltração, uma vez que este permite realizar um fraccionamento controlado e selectivo dos componentes do soro de leite.

Este trabalho tem como objectivo estudar o impacto de vários fraccionamentos em quantidade de teor e tipo de teor proteico, na produção de PHA. Nomeadamente, na primeira etapa do processo, a fermentação acidogénica, que tem como objectivo a conversão dos açúcares em ácidos gordos voláteis (VFA), sendo estes os precursores da produção de PHA. Também foi tida especial atenção ao impacto da diminuição do teor proteico no crescimento biológico, uma vez que o processo de produção de PHA é contínuo, e as proteínas são a única fonte de azoto fornecida aos microorganismos, na fermentação acidogénica, na etapa seguinte de selecção da cultura existe adição de fonte externa de azoto.

## **1.2. Estrutura**

A estrutura da tese é composta por 6 capítulos, incluindo o capítulo actual introdutório que descreve a motivação e objectivos e estrutura do trabalho desenvolvido na execução da dissertação. O capítulo 2 é uma introdução geral da produção de polihidroxialcanoatos utilizando uma cultura microbiana mista, das propriedades e composição do soro de leite, e por fim, da recuperação das proteínas do soro de leite pela aplicação de processos de separação com membranas. O capítulo 3 descreve todos os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do trabalho. O capítulo 4 é dedicado ao objectivo central do trabalho, numa

primeira parte são apresentados os resultados da aplicação dos processos de separação com membranas no fraccionamento do soro de leite e numa segunda parte o impacto da remoção parcial de proteínas no processo biológico. Por último o capítulo 5 descreve as conclusões retiradas no trabalho efectuado e os possíveis trabalhos futuros.

---

## **2. INTRODUÇÃO**



## **2.1. Produção de polihidroxicanoatos por uma cultura microbiana mista**

O elevado interesse da implementação da produção de polihidroxicanoatos (PHA) prende-se com o facto dos PHA poderem ser produzidos por fontes de carbono renováveis. Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis, com a vantagem de possuírem propriedades termoplásticas e características semelhantes às de elastómeros convencionais como o polietileno e o polipropileno. As suas características tornaram-se interessantes para um número significativo de aplicações industriais. Para além disto podem ser sintetizados por microorganismos a partir da utilização de fontes de carbono renováveis, permitindo um processo de produção sustentável [1] [2] [3] [4] [5]. Assim, os PHAs são considerados bons substituintes de plásticos sintéticos derivados do petróleo [6].

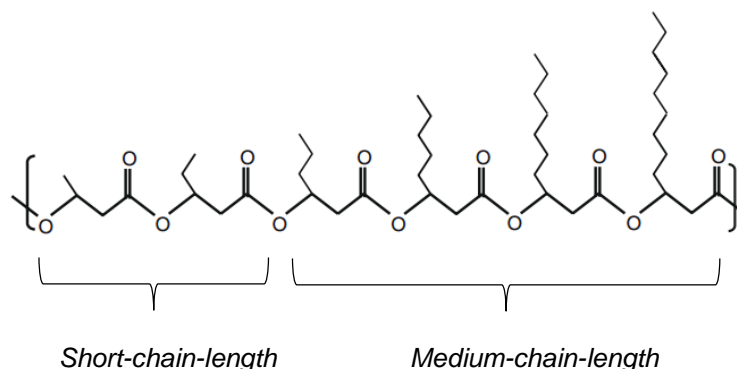
A implementação dos processos de produção de PHAs tem sido limitada devido aos seus elevados custos de produção, uma vez que os PHA são produzidos a partir de culturas puras e utilizando fontes de carbono refinadas. Do custo total da produção de PHA em larga escala, 40% é associado ao custo de matérias-primas [7] [8] [9]. De modo a diminuir os custos de produção de PHA foram recentemente desenvolvidos novos métodos de produção, tal como o uso de culturas microbianas mistas (CMM), em vez de culturas puras, como estudado por Albuquerque et. al (2007) [1]. O uso de uma CMM oferece diversas vantagens, comparativamente ao uso de culturas puras, nomeadamente requer menor investimento económico e menores custos de operação. O processo com CMM é um sistema aberto e não requer esterilização, o que permite uma diminuição da energia utilizada no processo. Por outro lado, permite a utilização de substratos baratos, tal como resíduos ou subprodutos da indústria, como o soro de leite, o que permite um decréscimo dos custos de matéria-prima [1] [10] [11].

### **2.1.1. Polihidroxicanoatos: estrutura química, propriedades e aplicação.**

PHA é uma família de biopolímeros com diversas estruturas. São poliésteres estruturalmente simples, sintetizados por microorganismos como substâncias naturais de reserva de carbono e energia e podem chegar a acumular 80%-90% do seu peso seco [12] [13]. São poliésteres de ácidos gordos hidroxilados acumulados no citoplasma das células, em estado amorfo, na forma de grânulo, e são reservas de carbono e energia, acumuladas na presença de excesso de fonte de carbono [14] [15] [16]. Os PHAs podem ser divididos em dois grupos principais, sendo o primeiro denominado por *short-chain-length* (scl-PHA), que contém unidades monoméricas com 3-5 átomos de carbono. O segundo grupo é designado por *medium-chain-length* (mcl-PHA), que contém unidades monoméricas de 6-18 átomos PHAs (Figura 2.1) [11].

Em geral, mcl-PHA tem um grau de cristalinidade inferior, temperaturas de transição vítrea e ponto de fusão mais baixos que scl-PHA. Por consequência, os mcl-PHA são referidos como elastómeros e os scl-PHA como termoplásticos. O mcl-PHA possui grupos funcionais, que permitem melhorar as propriedades físicas, e podem permitir a modificação química do PHA, aumentando assim as potenciais aplicações deste bio polímero [9]. Além das propriedades

termoplásticas e elastoméricas, os PHAs são ainda polímeros hidrofóbicos, biocompatíveis, não permeáveis a gases, inerte e estável em ar e possuem uma pureza muito elevada no interior na célula [11] [17].



**Figura 2.1.** Estrutura de monómeros de PHA com short-chain length (scl-PHA) e medium-chain-length (mcl-PHA). Adaptado de [17].

As propriedades dos PHAs dependem da composição dos monómeros, da microestrutura e distribuição do peso molecular e possuem uma estrutura semicristalina., com um grau de cristalinidade entre 40 a 80%. Dependendo do tamanho da cadeia que possuem os monómeros de PHAs podem afectar as propriedades térmicas do polímero, tal como o ponto de fusão e nível de cristalinidade [11] [18].

Os PHAs são utilizados como matéria-prima numa ampla variedade de aplicações, devido à sua ampla diversidade associada ao seu desenvolvimento. O facto de ser biodegradável e biocompatíveis, permitem que sejam aplicados na área médica e farmacêutica, como fabrico de suturas, implantes e constituintes de fármacos para libertação controlada [13] [17] [19].

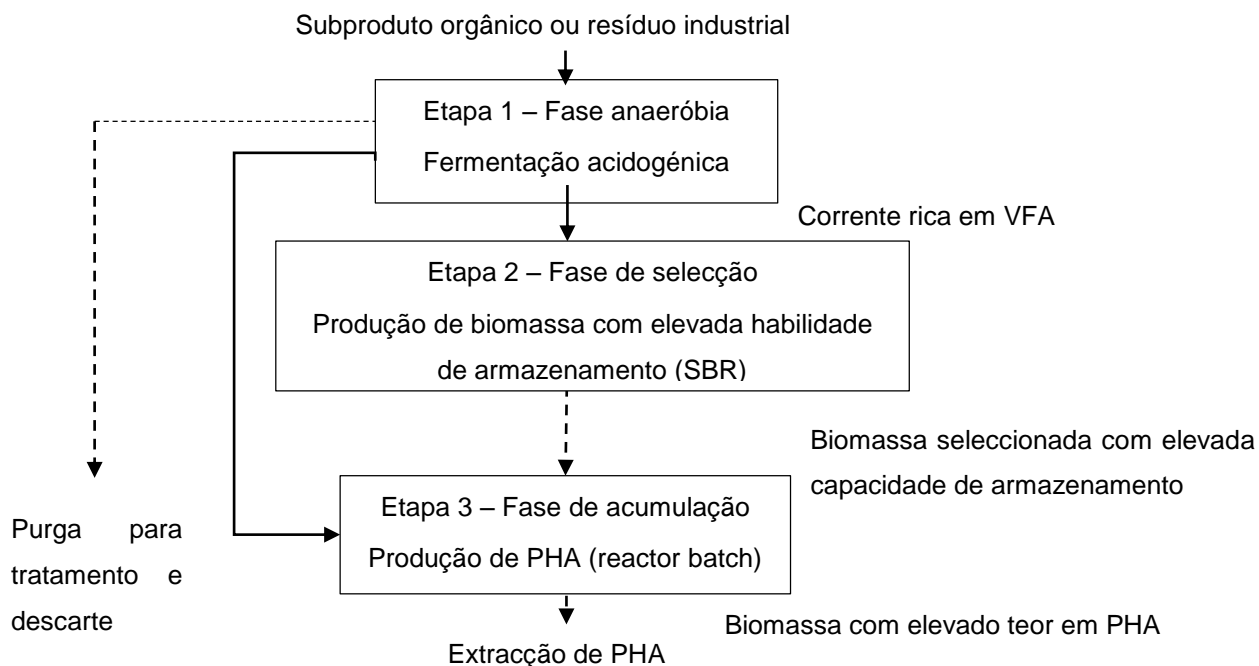
### 2.1.2. Biossíntese por cultura microbiana mista

Os processos de produção de PHAs envolvendo culturas microbianas mistas são normalmente operados em 2 ou 3 passos, dependendo do tipo de substrato utilizado como matéria-prima. A abordagem de duas etapas tem sido aplicada principalmente quando há substratos quimicamente definidos, usados como fonte de carbono para a produção de PHAs, como por exemplo VFA simples (acetato, propionato, butirato e valerato) ou misturas de VFA. No caso da utilização de substratos de baixo custo, como os resíduos ou excedentes da indústria, é normalmente realizado o processo de 3 fases (Figura 2.2) [2] [3] [7] [8]:

- i. Fermentação acidogénica, onde o conteúdo orgânico, como açúcares, constituintes do substrato são convertidos em ácidos gordos voláteis (VFA) em condições anaeróbias.
- ii. Selecção da cultura em condições de fome e fartura (FF) e operados num *Sequential Batch Reactor* (SBR);



- iii. Produção de PHA, concebido para maximizar a acumulação de PHA na cultura seleccionada em 2 e alimentado com o fermentado obtido na fase 1.



**Figura 2.2.** Esquema do processo usual de produção de PHA. Adaptado de [18].

Ao contrário da maioria das culturas puras, as CMM quando submetidas à fase de selecção, não conseguem armazenar carboidratos em forma de PHA, mas sim glicogénio. Assim, é necessário uma prévia fermentação anaeróbia, dos resíduos ou subprodutos da indústria, de modo a transformar o açúcar da sua composição em VFA, e este sim, posteriormente, pode armazenar PHA por uma CMM [1] [5]. O uso de CMM e matérias-primas fermentada permite a produção de uma ampla gama de monómeros que determinam as propriedades físicas e mecânicas do polímero final, sem ser necessário adicionar co-substratos como acontece no caso de fermentações com culturas puras [3] [20]. Assim a composição da corrente rica em VFA determina a composição final dos monómeros que constituem o PHA, uma vez que cada ácido gordo é precursor de um monómero diferente. O acetato é o substrato usado mais frequentemente na fase de selecção e é preferencialmente armazenado como PHB (polihidroxibutirato) [21]. A produção de PHA por MMC tem como vantagem a possibilidade de produzir co-polímeros de PHA numa maior gama de concentrações que as geralmente obtidas com culturas puras a partir de açúcares [1] [21]. Assim, são necessários mais estudos de modo a controlar os factores chave do processo, tal como estratégia de alimentação (contínua ou pulso), controlo de pH e microestrutura em CMM [11].

Diversos estudos demonstram que diferentes matérias-primas podem ser utilizadas na fermentação acidogénica, por exemplo, soro de leite, efluentes da indústria de papel e madeira, melaço de cana-de-açúcar e efluentes da produção de azeite. Os resultados dos estudos indicam que as matérias-primas foram fermentadas quase na sua totalidade, produzindo como

produto principal VFAs (acetato, propionato, butirato e valerato) [18]. Estudos efectuados mostram que não é necessária a adição de nutrientes extras, quando se utiliza soro de leite no processo de fermentação acidogénica, uma vez o soro de leite contém proteínas e outros compostos necessários ao metabolismo da cultura [3]. Por outro lado, estudos realizados com soro de leite para a produção de PHA (dados não publicados) demonstram a CMM precisa de suplementos de nutrientes na fase de acumulação de PHA, uma vez que o sistema é incapaz de usar a proteína do soro de leite para manter a sua performance, indicando que existe um teor proteico que pode ser retirada na primeira fase do processo (fermentação acidogénica).

## 2.2. Soro de leite

O soro de leite é um efluente agro-alimentar obtido após a precipitação de gorduras e caseínas do leite durante o fabrico de queijos. Na produção de 1Kg de queijo são originados 9Kg de soro de leite, o qual contém cerca de 55% do total dos nutrientes presentes no volume de leite utilizado [22].

A composição do soro de leite não é sempre a mesma e depende da técnica de produção de queijo utilizada, das variações sazonais, da espécie produtora de leite utilizado bem como da alimentação. Entre os compostos mais abundantes presentes no soro do leite encontram-se a lactose, proteínas solúveis, lípidos e sais minerais (Tabela 2.1) [23]. O soro de leite também pode conter ácido láctico e cítrico, compostos nitrogenados não-proteicos, vitaminas do grupo B, entre outros. De acordo com o procedimento usado na precipitação das caseínas, o soro de leite pode ser ácido (pH<5) ou doce (pH 6-7). O soro de leite ácido, também denominado de soro de leite salgado, possui uma maior quantidade de sais e menor quantidade de proteínas do que o soro doce. Como consequência da elevada salinidade, este é mais difícil de processar e os custos de despejo são mais elevados que os do soro de leite doce [24] [25].

**Tabela 2.1.** Composição do soro de leite. Adaptado de [24]

Nutrientes	Concentração (%w/w)
Lactose	4,5 – 5
Proteínas solúveis	0,6 – 0,8
Lípidos	0,4 – 0,8
Sais minerais (NaCl, KCl e sais de cálcio) <sup>1</sup>	8-10
Ácido láctico	0,05

<sup>1</sup>Em extracto seco

Estima-se que a produção de queijo, na União Europeia em 2004, tenha sido de 9 milhões de toneladas, dando origem a uma produção anual de 50 milhões de m<sup>3</sup> de soro de leite [26].

Devido ao elevado volume de produção, e o maior constituinte ser a lactose, o soro de leite possui uma alta carência bioquímica de oxigénio (CBO) de 30.000 – 50.000 ppm e uma

carência química de oxigénio (CQO) de 60.000 -80.000 ppm. Portanto, este representa um problema ambiental importante e que necessita tratamento antes de ser descartado para o meio ambiente [27]. No entanto, a situação pode ser vista como uma oportunidade de utilizar co-produtos que são potenciais matérias-primas para a produção de energia ou na obtenção de produtos de valor acrescentado [26].

A fracção de proteína do soro de leite representa 18-20% do total das proteínas do leite [28]. O perfil de proteínas presentes no soro de leite, representado na Tabela 2.2; contém 4 proteínas em maior quantidade:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) que representa 50% do total de proteínas de soro de leite, a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -LA) que representa 20% do total de proteínas de soro de leite, a albumina de soro de leite (BSA) e imunoglobulina (IGG). Estas últimas correspondem a 10% cada, do total de proteínas do soro de leite. Em menor quantidade estão ainda presentes a lactoferrina (LF), lactoperoxidase (LP) e lisozima (LI) (Tabela 2.2). Apesar da lactoferrina e lactoperoxidase estarem em pequenas quantidades são proteínas comercialmente importantes devido as suas propriedades biológicas [28] [23]. Na sua composição ainda é possível encontrar polipeptídeos, como as proteases-peptonas, glicomacropéptido (GP) e aminoácidos livres [29] [30].

**Tabela 2.2.** Características físicas das principais proteínas do soro de leite bovino. Adaptado [31]

Proteína	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Massa molecular (kDa)
$\beta$ – Lactoglobulina ( $\beta$ -LG)	2,7	18,36
$\alpha$ – Lactoalbumina ( $\alpha$ -LA)	1,2	14,15
Imunoglobulinas (IG)	0,65	150-1.000
Albumina de soro bovino (BSA)	0,4	66,0
Lactoferrina (LF)	0,1	78,0

As proteínas são uma componente importante do soro de leite, devido à sua ampla gama nutricional, biológica e às propriedades funcionais dos alimentos [32]. As proteínas possuem acções fisiológicas específicas, tal como capacidade de ligar metais, funções ligadas com o sistema imunológico ou digestivo e fonte de aminoácidos. Assim, possuem um importante papel fisiológico, onde apresentam propriedades bioactivas que contribuem para o bom funcionamento do organismo. Desta forma os compostos bioactivos são capazes de reduzir o risco de doença e/ou prevenir o seu desenvolvimento. Estes possuem uma elevada gama de utilização, desde o efeito nos ossos, nos músculos, no sangue, no metabolismo, na aprendizagem e envelhecimento [23].

A  $\beta$ -LG apresenta propriedades funcionais e gelificantes que beneficiam a sua utilização como aditivo alimentar. Possui ainda características antimicrobianas, que incluem os efeitos antibacterianos, anti-virais, e actividades anti-carcinogénicas. A  $\beta$ -LG é ainda importante no transporte de retinol, ácidos gordos e vitamina D [32] [33] [34].

A  $\alpha$ -LA apresenta propriedades importantes no controlo de aleitamento e secreção do leite, uma vez que actua como coenzima para a biossíntese da lactose [32]. Além da biossíntese de

lactose, a proteína  $\alpha$ -LA também possui a capacidade ligar-se a certos minerais, como cálcio e zinco. Possui também actividades antimicrobianas e anti-carcinogénicas em condições específicas de pH [29] [34] [35].

A BSA, devido ao seu tamanho e conformação, possui capacidade de se ligar a ácidos gordos livres, lípidos e compostos aromáticos. Esta possui ainda uma importante actividade anti-carcinogénica e antioxidante [23] [33] [34].

As imunoglobulinas estão presentes no plasma sanguíneo e nos fluidos fisiológicos de todos os mamíferos. Estas apresentam uma importante função imunológica, especialmente no colostro, e possuem propriedades antimicrobianas e antivirais [23] [33] [34] [35].

A lactoferrina têm diversas actividades biológicas associadas, tal como, propriedades antimicrobianas, antivirais, permite um aumento na resposta orgânica do sistema imunológico, anti carcinogénico e por último propriedades antivirais [29] [33] [34].

A desmitificação que o soro de leite é apenas um co-produto da indústria de lacticínios, permitiu um gradual aumento da utilização do subproduto como uma matéria-prima de valor acrescentado para o fabrico de alguns produtos. O seu valor nutricional e as suas propriedades foram identificados no final dos anos 80 [23] [33].

A recuperação de uma fracção do soro de leite pode permitir a produção de um composto de valor acrescentado em que a sua recuperação pode ser efectuada por aplicação de processos de separação, por exemplo, a ultrafiltração, osmose inversa e microfiltração. A selecção do processo adequado depende essencialmente do peso molecular do composto a recuperar e se a sua recuperação é efectuada a partir da solução de permeado ou retido do processo. Estes métodos permitem obter produtos como o soro de leite em pó, concentrados proteicos de soro de leite (*whey protein concentrates*, WPC), recuperação de lactose e o seu posterior processamento [28].

O despejo rentável do soro do leite é um dos grandes problemas das indústrias de lacticínios. Em suma, é possível aplicar diversas vias para minimizar os resíduos tal como [36]:

- Aplicação de técnicas de minimização da produção de soro de leite durante o fabrico do queijo;
- Uso do soro de leite como um subproduto na indústria alimentar;
- Produção de petroquímicos tal como o metano e metanol;
- Produção de ácido láctico e seus derivados, como potências solventes verdes;
- Produção de plásticos biodegradáveis e polímeros;

### 2.3. Processos de separação com membranas

Os processos de separação com membranas para processamento do soro de leite, permitem realizar uma separação selectiva e controlada dos componentes do soro de leite, pela escolha correcta das características da membrana utilizada. As características específicas da membrana devem estar de acordo com separação desejada e as propriedades de separação

dependem de determinados factores como: a natureza do material constituinte, tamanho de poros e sua distribuição [37].

Os processos de separação com membranas, em particular a ultrafiltração, apresentam um método alternativo bastante atraente no fraccionamento de proteínas. Este pode ser conduzido a baixas temperaturas e baixa pressão hidrostática, evitando-se alterações físico-químicas dos produtos, principalmente a desnaturação, perda de aroma e oxidação. Não há necessidade do uso de reagentes químicos. Além disso, ainda permite a realização de separação em sistema fechado que diminui o risco de contaminação [38] [39] [40].

A ultrafiltração fornece uma técnica atractiva para o processamento do soro de leite, porque permite o fraccionamento dos diferentes compostos presentes no soro de leite, essencialmente, de acordo com o peso molecular. Também é possível melhorar a separação com base na sua carga eléctrica com a superfície da membrana, pelo ajuste do pH e concentração salina do meio de alimentação. Em particular, a ultrafiltração, permitem reter, total ou parcialmente, moléculas como as proteínas de maior peso molecular do soro de leite. Por outro lado permite que as moléculas de baixo peso molecular, tal como a lactose, sais e água permeiem a membrana [41] [42]. A não retenção da lactose e sais por parte das membranas de ultrafiltração é importante, uma vez que as fracções obtidas foram produzidas com o intuito de serem utilizadas num processo biológico de produção de PHA, que necessita que a lactose integre a composição da matéria-prima, em teor igual ao do soro de leite não fraccionado [43].

A separação das proteínas também poderia ser efectuada por cromatografia, no entanto a utilização à escala industrial é complicada por dificuldades de *scale-up*, elevados custos de produção e baixa produtividade [44].

Baldosso *et. al* (2011) [45] refere que processos de ultrafiltração associados à diafiltração permitem um aumento do teor proteico no permeado, e diminui os problemas associados a elevada concentração de retido, enquanto mantém uma melhor performance do que quando ocorre concentração de retido. Para obter uma completa separação e diminuição da concentração do retido, este é diluído com adição de um solvente (água) com velocidade igual a velocidade de permeado. No entanto o volume de permeado obtido no ensaio de diafiltração é muito elevado e são necessários processos adicionais para concentrar o permeado, tal como a osmose inversa. Este permite que apenas a água permeei, não realizando um processo de separação, para além da efectuada na diafiltração, efectuada em determinadas condições de fraccionamento.

A selecção da membrana adequada para uma determinada aplicação requer atenção de diversos factores, incluindo compatibilidade química e temperatura com o material do processo, hidrofobicidade, características da solução de permeado e retido, durabilidade das características de desempenho da membrana, frequência de procedimentos de limpeza e custos associados.

Uma das características a ser analisada na fabricação das membranas está relacionada com o seu grau de hidrofobicidade e hidrofiliicidade. A escolha da utilização de membranas hidrofílicas

no processamento do soro de leite é apoiada pelo maior grau de reversibilidade na adsorção de proteínas em superfícies mais hidrofílicas, o que minimiza a redução do fluxo ao longo de um ensaio e facilita a limpeza da membrana [46] [37].

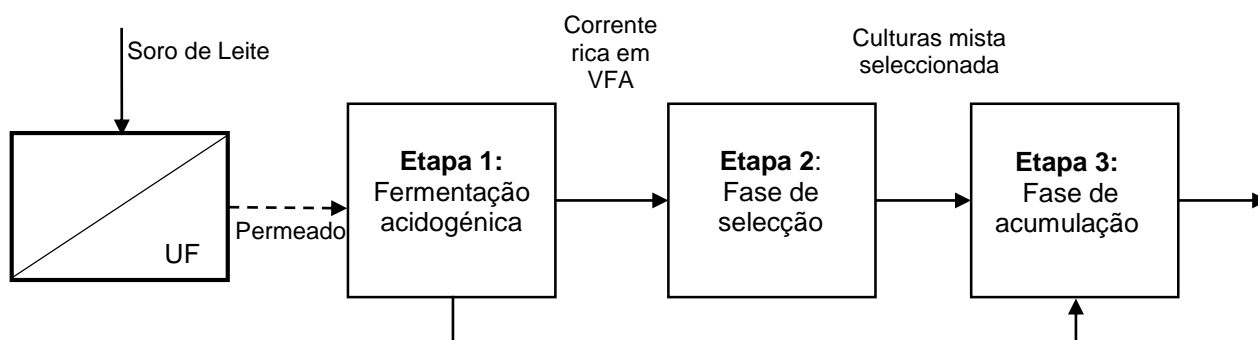
O processo de ultrafiltração também possui desvantagens associadas a colmatção da membrana (*fouling*), que resulta da acumulação de solutos, isto é, moléculas ou agregados moleculares na superfície ou interior dos poros da membrana, que pode conduzir a formação do bolo de filtração e consequente colmatção da membrana. Este é um fenómeno extremamente complexo e de grande preocupação na indústria de lacticínios. A acumulação de solutos na membrana relaciona-se com a sua capacidade de retenção. A colmatção da membrana provoca uma diminuição do fluxo de permeado ao longo do tempo. A acumulação de material na membrana pode alterar a selectividade e produtividade da membrana, pois pode sofrer alterações físicas e químicas na sua estrutura [41] [47] [48]. A acumulação de solutos na membrana (superfície e /ou interior dos seus poros) pode ser reversível ou irreversível, e depende da possibilidade da sua remoção por procedimentos de lavagem da membrana. O grau de reversibilidade pode ser determinado através do grau de recuperação de permeabilidade hidráulica da membrana após a sua lavagem no final do processo [37].

Marshall *et. al.* [46] reviu diversas formas de como o fluxo é afectado pelo efeito da colmatção da membrana quando a alimentação contém proteínas e pela comparação de vários modelos concluiu que o declínio do fluxo na primeira hora pode dever-se à adsorção de proteína ou à deposição de partículas e que o decréscimo do fluxo ao longo do tempo é devido à deposição de partículas por convecção. Nos primeiros minutos do processo o declínio do fluxo é associado à acumulação da concentração por polarização reversível.

Posto isto, é importante referir a diferença entre a concentração de polarização e colmatção da membrana. Ambas reduzem o fluxo e a resistência que oferecem ao fluxo de permeado são aditivas. Juntamente com a resistência intrínseca da membrana compõem as componentes da resistência total ao fluxo de permeado num processo com membranas. A permeabilidade da membrana ao solvente,  $J_v$ , é maior do que a permeabilidade dos solutos,  $J_p$ . Os solutos retidos podem acumular-se na superfície da membrana e a concentração pode aumentar gradualmente. Ao gradiente de concentração de componentes retidos perto da membrana é denominado de concentração por polarização. Com o aumento da acumulação de soluto na superfície da membrana, aumenta-se o gradiente de concentração que favorece a contra difusão do soluto da superfície da membrana para volume de retido. A concentração da polarização é uma função das condições hidrodinâmicas no sistema e é independente das propriedades físicas da membrana. A concentração por polarização é um fenómeno reversível e pode ser minimizada por a simples mudança nas condições de operação, sendo que o uso de escoamento tangencial a membrana, em vez do fluxo perpendicular, minimiza sensivelmente este efeito através do arraste de partículas na superfície da membrana [38] [43] [46].

## 2.4. Ponto de situação do estudo

Verificou-se que a procura de alternativas para substituir os plásticos convencionais tem vindo a aumentar e como alternativa surge a utilização dos PHA, um plástico biodegradável. No entanto a implementação da sua produção tem sido limitada devido aos elevados custos de produção e matéria-prima. Posto isto e uma vez apresentados os conceitos teóricos e as condições do processo de separação com membranas, o presente estudo pretende estudar a possibilidade de integrar um processo de separação com membranas de modo a produzir uma fracção do soro de leite em teor e tipologia específica, como um pré- tratamento do soro do leite antes de ser alimentado ao reactor onde ocorre a fase 1 do processo de produção de PHA (Figura 2.3). A possibilidade de recuperar uma fracção do soro de leite, rica nas proteínas de menor tamanho do soro de leite ( $\beta$ - LG e  $\alpha$ -LA) aponta para a produção dum produto de valor acrescentado permitindo aumentar a rentabilização económica do processo de produção de PHA por culturas mistas, devido às propriedades nutricionais, fisiológicas e bioactivas das proteínas e dos péptidos presentes.



**Figura 2.3.** Esquema do processo de produção de PHA com a integração do processo de ultrafiltração.



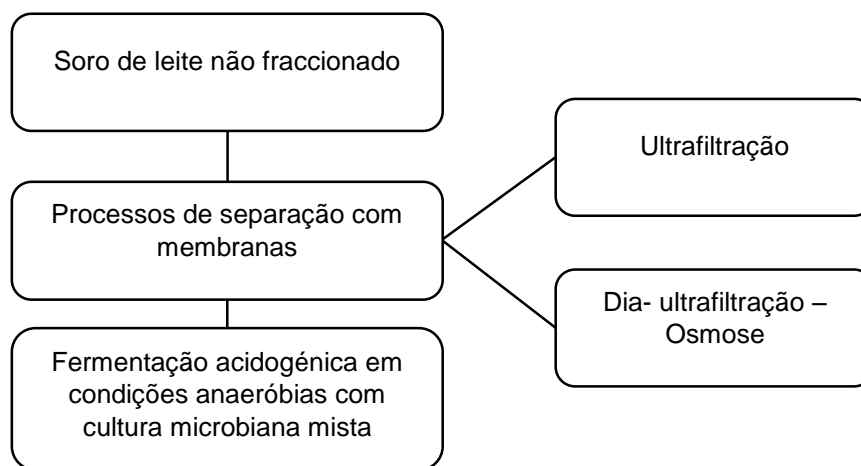


---

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**



No presente capítulo são apresentadas as actividades laboratoriais efectuadas no presente estudo. Foi efectuado o fraccionamento do soro do leite, utilizando processos de separação com membranas (ultrafiltração), com o objectivo de produzir diferentes fracções enriquecidas em componentes proteicas específicas. Numa segunda parte as fracções obtidas serviram de alimentação nos ensaios de fermentação acidogénica, onde se realiza a conversão dos açúcares do soro do leite em VFA, precursores na produção de PHA. O fluxograma das actividades realizadas encontra-se na Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Fluxograma das actividades experimentais realizadas.

### 3.1. Processos de separação com membranas

Foram efectuados processos de ultrafiltração com membranas de limite de exclusão molecular de 5 kDa, 10k Da, 30 kDa e 100 kDa, cujas características estão apresentadas na Tabela 3.1, com o objectivo de obter fracções de soro de leite com concentrações e tipologia variável de componente proteica. Todas as membranas utilizadas no processo de ultrafiltração possuem características de ter uma camada activa hidrofílicas, que apresenta vantagem no processamento do soro de e leite, tal como, redução da colmatção da membrana. A reversibilidade das ligações responsáveis pelas interacções de proteína com superfícies hidrofílicas possuem um caracter mais reversível do que as que são estabelecidas com superfícies hidrofóbicas, promovendo um melhoramento no fluxo do permeado e facilitando a limpeza e recuperação das características iniciais.

**Tabela 3.1.** Características das membranas usadas nos processos de separação com membranas.

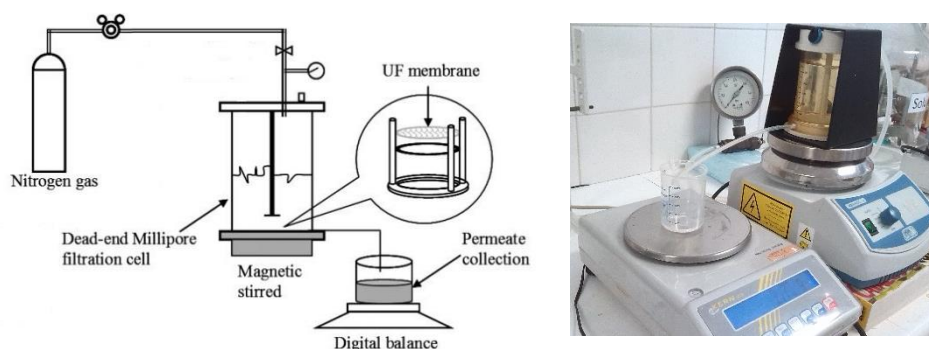
Nomenclatura	Marca	Material	MWCO <sup>1</sup> (kDa)	Processo Membranar
M5	Millipore – Ultracel ® 30kDa	Celulose regenerada	5	Ultrafiltração
M10	Millipore – Ultracel ® 10kDa	Celulose regenerada	10	Ultrafiltração
M30	Sartorius AG – HY UF 30kDa	Celulose regenerada	30	Ultrafiltração
M100	Millipore Millipore – Ultracel ® 100kDa	Celulose regenerada	100	Ultrafiltração

<sup>1</sup>: limite de exclusão molecular

O material da camada activa das membranas M5, M10 e M100, celulose regenerada, confere à membrana uma estrutura uniforme, robusta, e com elevada integridade e resistência quando lhe é aplicada pressão [49] [50].

### 3.1.1 Montagem experimental

A instalação de ultrafiltração utilizada era constituída por uma unidade de ultrafiltração operada em modo *dead-end* com agitação contínua e pressurizada, Amicon 8400 Millipore. Esta célula de filtração possui a capacidade volumétrica total de 400mL e permite acoplar membranas com área efectiva de 41,8cm<sup>2</sup>. A célula foi operada a pressão transmembranar constante (TMP), regulada pela pressurização da célula com um gás inerte (azoto), medido durante cada ensaio com um manómetro posicionado na linha de azoto e à entrada da célula. Os ensaios foram realizados com agitação constante (100 rpm), para minimizar a formação de bolo à superfície da membrana e a colmatagem da membrana. A massa de permeado ao longo do tempo foi monitorizada por uma balança analítica (Kern 470), e os dados adquiridos com o auxílio de um computador. A unidade de ultrafiltração *dead-end* encontra-se esquematizada na Figura 3.2.



**Figura 3.2** Esquema do sistema *dead-end* do processo de ultrafiltração. Adaptado [54]

Os ensaios de ultrafiltração foram realizados à temperatura ambiente e foram realizados ensaios a pressão transmembranar constante e ensaios com aumento e decréscimo controlado e progressivo da pressão transmembranar entre 0 e 0,6bar, sendo efectuado um aumento

gradual numa primeira parte do processo, seguindo-se de um decréscimo gradual (Tabela 3.2). O volume de soro de leite utilizado foi de 300mL numa concentração de 20g/L em soro de leite.

**Tabela 3.2.** Condições de pressão transmembranar (TMP) usados nos ensaios de ultrafiltração.

Ensaio	Membrana	MWCO <sup>1</sup> (kDa)	TMP (bar)
UF 1	M5	5	0,5
UF 2	M5	5	0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,25 - 0,3
UF 3	M5	5	0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,25 - 0,3
UF 4	M10	10	0,03 - 0,06 - 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,4 - 0,6
UF 5	M10	10	0,03 - 0,06 - 0,1 - 0,3 - 0,6 - 0,3 - 0,1 - 0,06 - 0,03
UF 6	M30	30	0,03 - 0,06 - 0,1 - 0,3 - 0,6 - 0,3 - 0,1 - 0,06 - 0,03
UF 7	M30	30	0,03
UF 8	M30	30	0,6
UF 9	M100	100	0,6

<sup>1</sup>: limite de exclusão molecular

As características do soro de leite usado nos processos de separação com membranas estão descritas na Tabela 3.3, proveniente da Lactogal (Porto, Portugal)

**Tabela 3.3.** Caracterização do soro de leite segundo a Lactogal.

Soro de leite em pó	
Conteúdo em lactose (%w/w)	78,4
Conteúdo em proteína (%w/w)	13,6
Conteúdo em gordura (%w/w)	1,21

### 3.1.2 Compactação da membrana

Antes da utilização da membrana nos processos de separação, foi necessário a compactação da mesma e a remoção da camada protectora de glicerol. Para tal, foram permeados no mínimo 3 volumes de célula (3x 350mL) numa gama de pressão transmembranares de 0 a 1,5 bar. De modo a garantir uma boa estabilidade estrutural ao longo dos ensaios, e remover a camada de glicerol, a membrana foi previamente permeada com água desionizada a diferentes pressões transmembranares, desde 0 a 1,5 bar (pressão superior a pressão transmembranar máxima usada nos ensaios com soro de leite). Este procedimento permite minimizar as mudanças estruturais e a morfologia das características da membrana. Após a compactação da membrana foi determinada a permeabilidade hidráulica ( $L_{pi}$ ), através da medição do fluxo de permeado de água desionizada a diferentes pressões transmembranares aplicadas ao sistema. A determinação da  $L_{pi}$  foi importante, de modo a determinar a condição inicial da membrana, valor de referência para determinar se a membrana recuperou as condições iniciais depois da realização do ensaio.

### 3.1.3 Procedimento de limpeza da membrana

No final de cada ensaio foi necessário proceder à limpeza da membrana, no módulo onde foi efectuado o ensaio à pressão constante de 0,2 bar em que o líquido de limpeza foi água desionizada, de modo a restituir ou recuperar ao máximo as características iniciais da membrana, que afectaram o fluxo de permeado no processamento do soro do leite, causado pelos fenómenos de colmatação da membrana ou concentração por polarização. Assim, a lavagem da membrana tem como objectivo recuperar a permeabilidade inicial. Antes de se proceder à lavagem da membrana foi medida a permeabilidade de modo analisar o quanto é que esta foi afectada, com o processamento do soro de leite. O processo foi repetido até se atingir a máxima recuperação da permeabilidade hidráulica da membrana.

### 3.1.4 Ensaio de dia-ultrafiltração

De modo a reduzir os fenómenos de colmatação da membrana e/ou a concentração por polarização, observados nos ensaios de ultrafiltração e aumentar o teor proteico do permeado, foi realizada uma dia-ultrafiltração. A unidade de ultrafiltração usada foi a METcell (Membrane Extraction Technology, London), com montagem do sistema semelhante ao da ultrafiltração, mas contrariamente a célula Amicon permitiu acoplar uma linha de adição de água, de modo a manter o volume de solução dentro da célula constante. A célula METcell possui a capacidade volumétrica máxima de 275mL e permite acoplar membranas com área efectiva de 51,4cm<sup>2</sup>.

O controlo do volume dentro da célula foi efectuado pela comparação do volume de permeado e água adicionada. Para adicionar água ao sistema, foi necessário uma bomba para bombear a água contida num depósito para a célula. O volume inicial para a realização da dia-ultrafiltração foi de 150mL com uma concentração de soro de leite de 20g/L. O ensaio foi realizado a pressão transmembranar constante de 0,6 bar, à temperatura ambiente, com uma membrana de 30kDa de limite de exclusão molecular e agitação constante. A compactação e limpeza da membrana foi semelhante à efectuada para os ensaios de ultrafiltração. Após o ensaio de dia-ultrafiltração foi necessário concentrar o permeado obtido pela aplicação de osmose inversa, no mesmo sistema mas sem a linha de água acoplada. O ensaio foi realizada à pressão transmembranar de 28 bar, com a membrana SW30 (Filmtec, DOW) e à temperatura ambiente.

À solução de alimentação, retido e permeado recolhido ao longo do tempo nos ensaios efectuado, foi determinado a concentração de lactose, concentração total de proteína e tipologia de proteína.

## 3.2. Fermentação acidogénica

### 3.2.1 Inóculo

O inóculo usado no presente estudo foi uma cultura microbiana mista acidogénica, recolhida num bioreactor membranar anaeróbio (MBR) operado em contínuo a temperatura controlada a 30°C e pH 6, alimentado com soro de leite na concentração de 20g/L, contendo uma carga

orgânica aproximadamente de 15g de lactose /Ld, para produção de VFA. A biomassa recolhida foi centrifugada durante 30 min a 6.000 rpm a uma temperatura de 23°C de modo a retirar a máxima quantidade de VFA do sistema a fim de não haver uma inibição por produto.

### 3.2.2 Meio de cultura

O meio de cultura dos ensaios anaeróbios, juntamente com o inóculo descrito anteriormente, foi composto por uma solução aquosa de bicarbonato de sódio 1,5g/L no volume de 20mL de trabalho, solução aquosa de resazurina 1g/L e solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  0,135M. O bicarbonato de sódio foi usado como tampão de modo a manter o pH do meio de cultura constante. A resazurina é um indicador da presença de  $\text{O}_2$  que muda de cor quando adicionado o  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  e quando estamos perante uma condição anaeróbia [51].

O substrato que foi usado como alimentação na fermentação acidogénica, analogamente ao substrato usado no MBR, foi o soro de leite proveniente da Lactogal (Porto, Portugal), nas mesmas condições que nos processos de separação com membranas e de acordo com as especificações da Tabela 3.3.

### 3.2.3 Procedimento experimental

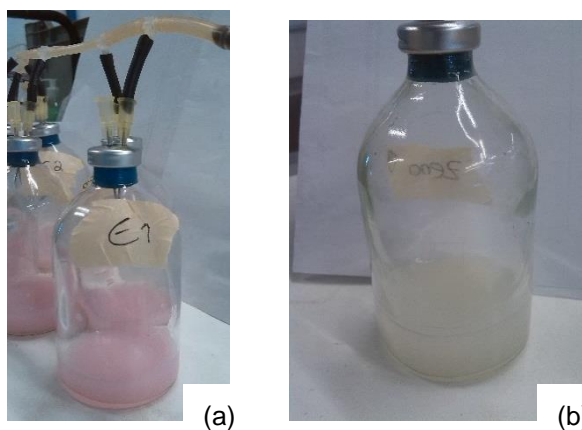
Os ensaios foram realizados em frascos de soro de 100mL (20mL de volume de trabalho) de modo a reproduzir um reactor fechado. Os ensaios foram realizados em condições anaeróbias onde ocorre fermentação acidogénica, isto é, existiu a conversão de lactose em ácidos orgânicos (lactato, acetato, propionato, butirato e valerato). Os ensaios tiveram duração de 30h e foram realizados à temperatura controlada de 37°C, pH de 6 e sofreram uma agitação constante de 150 rpm. O controlo da temperatura foi conseguida pela realização dos mesmos numa sala com temperatura controlada a 37°C. Foi necessário agitar manualmente os frascos, uma a duas vezes ao dia, de modo a dissolver possíveis depósitos de biomassa que possam ficar depositada nas paredes do frasco.

O volume do inóculo adicionado foi determinado de modo a obter uma concentração de 5g/L de biomassa num volume total de 20mL de volume de trabalho. A concentração do inóculo foi obtido pelo valor dos sólidos suspensos voláteis (VSS) determinado após a centrifugação. Em relação ao volume do substrato (soro de leite) fornecido foram efectuados ensaios com 14 e 8 mL. O volume das restantes soluções que compõem o meio do ensaio foram 10μL da solução de resazurina e 1 gota da solução de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . O volume da solução de bicarbonato de sódio foi determinado pela subtracção da soma dos volumes de inóculo e de substrato, aos 20mL de volume de trabalho.

Em todos os ensaios realizados foi sempre preparado um frasco denominado frasco branco ou de controlo, em que o volume de substrato foi substituído por água da torneira, de modo a não causar choque de iões. O frasco branco foi utilizado para verificar a resposta do inóculo sem a adição de substrato. Todos os volumes acima mencionados são determinados tendo em conta

o número total de frascos a realizar por cada ensaio, uma vez que o meio preparado foi o mesmo para todos os frascos.

De modo a garantir as condições anaeróbias do ensaio foi realizado um *flush* nos frascos, isto é, foram colocadas duas agulhas, depois do frasco encapsulado, e efectuada a passagem de azoto por uma delas até a cor do meio esbranquiçada, como ilustra a Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Frascos de soro antes de realizar *flush* (a) e depois (b).

A preparação dos frascos de soro para os ensaios foi realizada na seguinte ordem:

1. Juntar a solução de bicarbonato de sódio e solução de resazurina;
2. Acertar o pH a 6 com soluções de NaOH 4M ou HCL 2M;
3. Adição do inóculo;
4. Distribuição do meio preparado de igual forma pelos frascos do ensaio a realizar e encapsulação dos mesmos;
5. Adição de uma gota da solução  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  com o auxílio de uma seringa;
6. Realização de *flush* com um gás inerte (azoto) até mudança de cor do indicador de  $\text{O}_2$ ;
7. Colocação dos frascos na sala com temperatura controlada cerca de 24h, sob agitação, de modo a estabilizar o inóculo à temperatura de 37°C;
8. Adição do substrato (soro de leite).

Ao longo do ensaio foram retiradas amostras de 1,5mL distribuídas no intervalo de tempo de 30h, perfazendo um volume total de 12mL. As amostras retiradas foram analisadas em termos concentração de ácidos, concentração de lactose e concentração de proteína.

### 3.3 Cálculos

#### 3.3.1 Processos de separação com membranas

Ao longo dos ensaios de ultrafiltração a massa de permeado foi monitorizada por computador ao longo do tempo de ensaio. Assumindo que o permeado do soro de leite possui a mesma densidade da água ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), foi determinado o volume de permeado ( $\text{dm}^3$ ), pela divisão da



massa de permeado (g) pela densidade da água. O caudal de permeado (Q) (dm<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>) num determinado instante do ensaio, foi determinado pela divisão do volume obtido, pelo respectivo intervalo de tempo. Por fim, o fluxo volumétrico do permeado foi determinado pela Eq. 1, em que  $J_v$  é o fluxo volumétrico do solvente (dm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), Q é o caudal de permeado (dm<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>) e A a área da membrana (m<sup>2</sup>) [37].

$$J_v = \frac{Q}{A} \quad \text{Eq. 1}$$

Nos processos de separação conduzidos sob o gradiente de pressão, a proporcionalidade entre o fluxo volumétrico e a força motriz (pressão) é dado pela Eq. 2, em que  $L_p$  representa a permeabilidade hidráulica da membrana (dm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>.bar<sup>-1</sup>), TMP a diferença de pressão hidrostática ou pressão transmembranar (bar) e  $\Delta\pi$  a diferença da pressão osmótica (bar) [48].

$$J_v = L_p(\Delta_{TMP} - \Delta\pi) \quad \text{Eq. 2}$$

Uma vez que a pressão exterior é 1bar, e o manómetro usado para controlar a pressurização do sistema lê pressões relativas, a diferença de pressão transmembranar considerada foi o valor lido directamente do manómetro. A componente associada à diferença de pressão osmótica é normalmente desprezável nos processos de ultrafiltração. Para tal a condutividade da solução de permeado e retido foi monitorizada ao longo do tempo para confirmar que a retenção salina não foi verificada.

O coeficiente de rejeição aparente da membrana ( $R_a$ ) reflecte a capacidade de uma membrana reter um determinado soluto e pode ser descrito pela Eq. 3. Onde  $C_p$  representa a concentração de um determinado soluto na alimentação ou retido (g.L<sup>-1</sup>) e  $C_f$  a concentração do mesmo soluto no permeado (g.L<sup>-1</sup>) [37] [46] [50].

$$R_a = 1 - \frac{C_p}{C_f} \quad \text{Eq. 3}$$

O coeficiente de permeabilidade de soluto (*sieving coefficient*) (S) foi obtido por Eq. 4., em que i pode representar a permeabilidade total do soluto, ou a análise de um soluto em particular ( $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, BSA, NI e IGG) [50].

$$S_i = \frac{C_p}{C_f} \quad \text{Eq. 4}$$

O fluxo volumétrico de permeado possui uma linearidade ao longo do tempo, apenas quando a resistência intrínseca da membrana actua sobre no sistema. Os fenómenos de concentração por polarização e/ou de colmatação da membrana afectam o fluxo de permeado. A pressão transmembranar a partir do qual se verifica o efeito da presença de fenómenos de colmatação da membrana ou concentração por polarização é designada por pressão transmembranar crítica e o fluxo de permeado obtido a esta pressão fluxo de permeado crítico. A partir destes valores o fluxo de permeado aumenta não linearmente em função da pressão transmembranar até um valor de pressão a partir do qual o fluxo de permeado se torna independente desta,

fluxo de permeado limitante. De modo a determinar a pressão transmembranar crítica, foi representado os fluxos volumétricos para a água desionizada e para o soro e leite, em função da pressão transmembranar aplicada. Foi aplicada o melhor ajuste aos pontos experimentais linear ou exponencial, representados e calculado o ponto de intersecção das duas linearizações [37] [50].

### 3.3.1 Fermentação acidogénica

A concentração de VFA produzidos corresponde à soma de todas as concentrações de ácidos orgânicos. As concentrações foram medidas por HPLC (*high performace liquid chomatography*). A concentração da biomassa foi determinada por os sólidos suspensos voláteis (VSS).

O crescimento de biomassa ( $\Delta X$ ) foi determinado pela Eq. 5, ao final das 30 horas do processo.

$$\Delta X = \frac{(VSS_f - VSS_i)}{VSS_i} \quad \text{Eq. 5}$$

O rendimento de crescimento ( $Y_{x/lactose}$ ) ( $g \times .g^{-1} \text{ Lactose}$ ) e o rendimento de produção de VFA ( $Y_{VFA/lactose}$ ) ( $g \text{ VFA} \cdot g^{-1} \text{ lactose}$ ) para o intervalo de tempo de 30h. Os rendimentos foram obtidos pela fracção do crescimento da biomassa e a produção de VFA, pelo substrato consumido no respectivo intervalo de tempo.

O soro de leite fraccionado refere-se ao soro obtido nos processos de separação com membranas e o soro de leite bruto refere-se àquele que não sofreu qualquer pré-tratamento. A designação adoptada para representar cada ensaio é constituído por uma letra, referente ao conjunto ao qual o ensaio pertence (A, B ou C) e por um número que representa o número no conjunto de ensaios, por exemplo A.1 referir-se-á ao ensaio número 1 do conjunto de ensaios A. O número zero refere-se ao reactor alimentado com soro de leite bruto, também denominados de reactor de referência.

A velocidade específica de consumo de lactose ( $-q_{lactose}$ ) e velocidade específica de consumo de proteína ( $-q_{prot}$ ) foram determinadas pela fracção da velocidade de consumo por a concentração inicial da biomassa. As velocidades de consumo foram calculadas dividindo o consumo de lactose e consumo de proteína, pelo intervalo de tempo  $t=6h$ , uma vez que os resultados possuem uma linearidade nesse intervalo de tempo.

O consumo de cada tipo de proteína foi determinado por Eq. 6, ao final das 6 e 30 horas do processo, em que o  $i$  representa o tipo de proteína ( $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, BSA, NI e IGG).

$$\text{Consumo da proteína } i = \frac{(\text{Concentração de } i_{t=0} - \text{Concentração de } i_{t=6;30})}{\text{Concentração de } i_{t=0}} \quad \text{Eq. 6}$$

### 3.4 Métodos Analíticos

A concentração de ácidos orgânicos voláteis (VFA), nomeadamente butirato, lactato, propionato, acetato e valerato, e concentração de lactose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um cromatógrafo Merck-Hitachi equipado com um detector de índice de refração (RI) e uma pré-coluna e coluna Metacarb 87-H Varia. O eluente utilizado foi ácido sulfúrico 0,001M, com caudal de 0,5 mL/min e temperatura de operação de 30 °C. As amostras foram centrifugadas com filtros de centrifuga (filtro de 0,45µm) a 12.000 rpm durante 10min. A concentração dos ácidos orgânicos foi determinada através das curvas padrão, com um intervalo de concentração de 31 a 1000 mg/L.

A concentração da biomassa foi estimada de acordo com a quantidade de sólidos suspensos voláteis (VSS), determinados de acordo com os Standard Methods [52].

A quantificação do teor proteico foi efectuada espectrofotometricamente a 750 nm usando o reagente de folin como descrito por Lowry [53]. A concentração do teor proteico foi determinada através da curva padrão de BSA, com um intervalo de concentração de 10 a 200mg/L.

Para avaliar a tipologia de proteínas em estudo, foi realizada um método de separação, a electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida e dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi utilizado o gel Amersham ECL Gel 12% (10 poços) e como fonte de alimentação a Amersham ECL Gel Box, ambas da GE Healthcare. O procedimento experimental efectuado esteve de acordo com as especificações do manual. O marcador de peso molecular, NZYColour Protein Marker II (Nzytech), tem uma gama de 11 a 245 kda contendo uma mistura de 12 proteínas padrão altamente purificadas. As fotografias do gel registadas pela EL Logic 100 Imagin System da Kodak e obtidas na ferramenta informática Kodak 1D v.3.6.0. Posteriormente a imagem do gel foi analisada para quantificar as proteínas no programa ImageJ.



---

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



#### 4.1 Fraccionamento do conteúdo proteico do soro de leite por aplicação de processos com membranas

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da etapa experimental do fraccionamento do soro do leite, por aplicação de processos de separação com membranas. O objectivo do fraccionamento foi produzir fracções da solução de soro de leite (permeados) com concentração e tipologia específica de determinado conteúdo proteico de soro de leite. Os permeados são posteriormente fornecidos a uma cultura microbiana mista (CMM), em condições anaeróbias, para a produção de VFAs por fermentação acidogénica. A alimentação de uma solução de soro de leite com concentração e tipologia específica teve por objectivo perceber o impacto da redução do teor proteico na produção de VFAs, que são os precursores na produção de PHA, através do mínimo teor proteico fornecido, para que se consiga rentabilizar economicamente o processo de produção de PHA. O potencial do excesso proteico presente no soro de leite poderá ser recuperado por fraccionamento por ultrafiltração, permitindo aumentar a rentabilização económica do processo através da sua comercialização (valorização pelas propriedades bioactivas de algumas proteínas e péptidos) ou a sua utilização como matéria-prima de outros processos.

Para conseguir o fraccionamento do soro de leite, foram aplicados processos de separação com membranas, nomeadamente membranas de ultrafiltração, de modo a reter selectivamente algumas proteínas. Os estudos de fraccionamento do soro de leite foram realizados com 4 membranas de celulose regenerada, com diferentes limites de exclusão molecular. A ultrafiltração foi realizada em modo *dead-end*, a pressão transmembranar controlada, numa gama de 0,03 a 0,6bar (Tabela 4.1), e com uma solução de 20g/L de soro de leite, como descrito na secção 3.1.

**Tabela 4.1.** Condições de operação dos ensaios de ultrafiltração (tamanho do limite de exclusão molecular da membrana e pressão transmembranar usada).

Ensaio	Membrana	MWCO <sup>1</sup> (kDa)	TMP (bar)
UF 1	M5	5	0,5
UF 2	M5	5	0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,25 - 0,3
UF 3	M5	5	0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,25 - 0,3
UF 4	M10	10	0,03 - 0,06 - 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,4 - 0,6
UF 5	M10	10	0,03 - 0,06 - 0,1 - 0,3 - 0,6 - 0,3 - 0,1 - 0,06 - 0,03
UF 6	M30 I	30	0,03 - 0,06 - 0,1 - 0,3 - 0,6 - 0,3 - 0,1 - 0,06 - 0,03
UF 7	M30 I	30	0,03
UF 8	M30 I	30	0,6
UF 9	M100	100	0,6

<sup>1</sup>MWCO: limite de exclusão molecular

A escolha de membranas, com diferentes limites de exclusão molecular, tiveram como objectivo produzir permeados com diferentes teores proteicos. A escolha da membrana de 5 kDa teve por objectivo a produção de um permeado sem as proteínas do soro do leite, uma vez

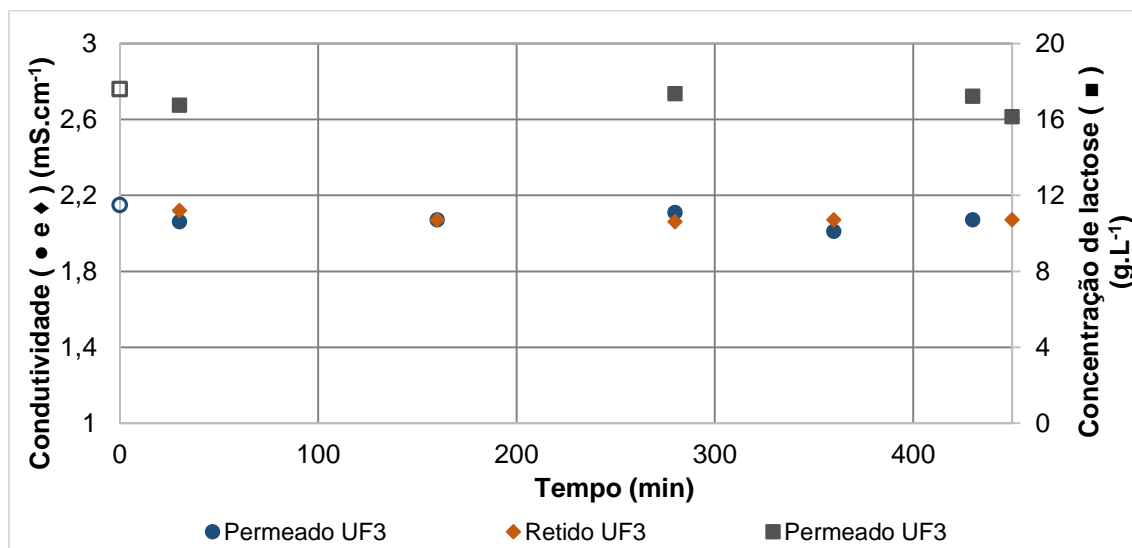
que a proteína de menor tamanho, presente no soro de leite, tem 14 kDa ( $\alpha$ -LA) de peso molecular. Pela análise do gel de SDS-PAGE realizado com os permeados obtidos, observou-se que o permeado não continha nenhuma proteína com peso molecular superior a 11 kDa (menor peso molecular da amostra padrão utilizada). Na secção 4.2.2 (Fermentação acidogénica: soro de leite fraccionado), observou-se que quando se fornece ao sistema o permeado obtido no ensaio UF1 (M5), com um teor proteico de 0,14-0,16 g/L de teor proteico (concentração nos 20mL de volume nos ensaios de fermentação acidogénica) correspondendo a uma redução de 93-94% do teor proteico presente no soro de leite, este não foi suficiente para alcançar a mesma eficiência na produção de VFA e do crescimento celular, comparativamente ao ensaio realizado com soro de leite não fraccionado. Como tal, utilizaram-se membranas de limite de exclusão molecular superior, inicialmente de 10 kDa e posteriormente de 30 kDa. Esta última, além de aumentar o teor proteico, teve por objectivo obter um permeado enriquecido em  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG, as proteínas de menor peso molecular e em maior quantidade do soro de leite (Tabela 2.1). Uma vez que os ensaios realizados com os permeados obtidos com as membranas de 10kDa e 30kDa, em que o teor proteico obtido foi de 0,22 g/L (redução de 90% em teor proteico em comparação com o teor proteico do soro de leite não fraccionado) e de 0,30g/L (redução de 87% em teor proteico em comparação com o teor proteico do soro de leite não fraccionado), respectivamente para os permeados obtidos com a membrana de 10 kDa e de 30 kDa, não foram suficiente para permitir alcançar a mesma eficiência na produção de VFA e do crescimento celular, comparativamente aos ensaios realizados com soro de leite não fraccionado (secção 4.2.2), foi escolhida com uma membrana com maior limite exclusão molecular (100kDa), em que foi obtido um permeado constituído por toda a tipologia do soro de leite e continha 0,50-0,30g/L em teor proteico (redução entre 50-70% de teor proteico em comparação com o teor proteico do soro de leite não fraccionado). Assim a escolha desta membrana teve como objectivo a produção de um permeado com maior variedade de proteínas do soro de leite.

Como mencionado anteriormente, os permeados obtidos são posteriormente utilizados como alimentação numa CMM, a fim de realizar a fermentação acidogénica em condições anaeróbias. Como tal, a selecção da membrana mais adequado para a produção de permeados com conteúdos proteicos ideais teve em conta também o critério de não retenção de lactose ou sais, uma vez que o objectivo era produzir um permeado em condições semelhantes ao soro de leite, excepto no teor proteico. A manutenção da concentração de lactose foi importante porque é um factor chave na fermentação acidogénica.

A fim de confirmar a permeação da lactose e dos sais pela membrana, foi analisada a concentração de lactose e a condutividade da alimentação, dos permeados e dos retidos ao longo do tempo do ensaio realizados com a membrana de 5 kDa (a membrana com menor limite de exclusão molecular utilizada). Verificou-se que a concentração de lactose e a condutividade nos permeados e nos retidos, em relação a alimentação foram semelhantes, portanto a membrana de 5 kDa não retém lactose nem sais (Figura 4.1). A condutividade determinada ao longo do tempo elucida sobre a variação da concentração salina entre o retido



e o permeado. A não rejeição de sais e lactose era espectável para uma membrana de ultrafiltração [36]. Uma vez que os resultados mencionados foram obtidos para a membrana de 5 kDa, e tendo esta o menor limite de exclusão molecular, das membranas de ultrafiltração utilizadas, considerou-se que nenhuma das restantes membranas utilizadas (com limite de exclusão superior) retêm lactose ou sais, produzindo assim permeados apenas com tipologia e teor proteico diferente do soro de leite.

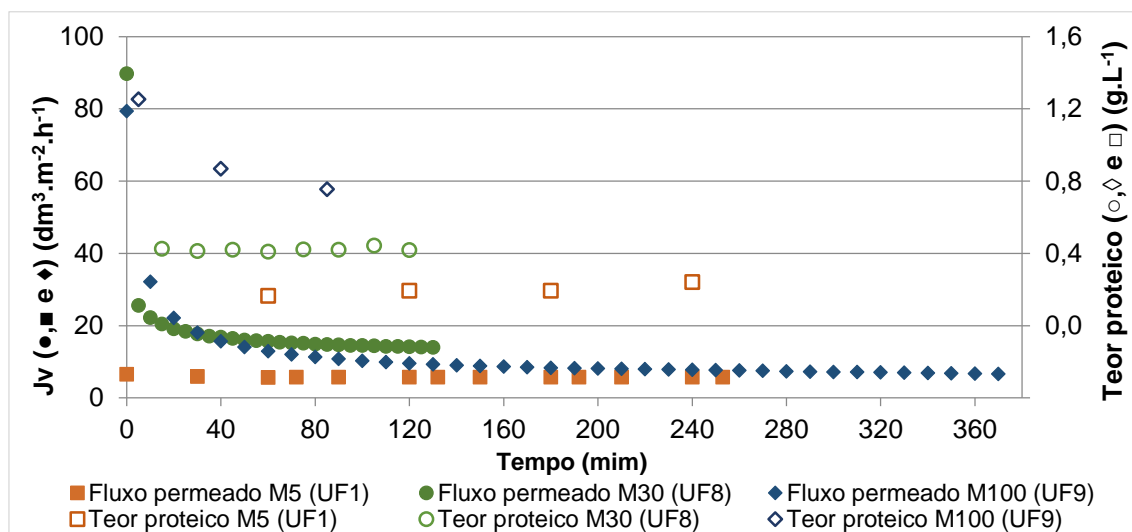


**Figura 4.1.** Concentração de lactose e condutividade da alimentação, permeados e retidos, ao longo do tempo para o ensaio com a membrana de 5kDa (ensaio UF3). (□ e ○ representam os valores de condutividade e concentração de lactose do soro de leite inicial, utilizado como alimentação do processo UF).

#### 4.1.1 Ensaio realizados a pressão transmembranar constante

Na primeira fase do estudo, foram realizados ensaios a pressão transmembranar constante ao longo do tempo de 0,5bar com membrana de 5kDa (UF1) e de 0,6 bar com membrana de 30 e 100 kDa (UF8 e UF9, respectivamente). Em primeiro lugar, verificou-se que o fluxo de permeado aumenta com o aumento do limite de exclusão molecular da membrana. (Figura 4.2). Verificou-se um decréscimo de fluxo de permeado, em relação ao fluxo inicial com água desmineralizada, de 12% e de 85% para as membranas de 10 e 30 kDa, respectivamente (Figura 4.2). Observou-se ainda que o ensaio com a membrana de maior limite de exclusão (100 kDa) possuiu o maior decréscimo de fluxo de permeado superior às anteriores, de cerca de 97%, em comparação com o fluxo do tempo  $t=0$  min, determinado com água desionizada. A redução do fluxo de permeado pode dever-se a fenómenos de concentração por polarização resultante da pressão aplicada e consequentemente acumulação das proteínas retidas à superfície da membrana, e colmatação de membrana (*fouling* da membrana) em consequência do depósito das proteínas à superfície da membrana ou no interior dos poros. Os dados indicam que o fluxo de permeado foi tanto mais prejudicado por fenómenos de colmatação da membrana e/ou concentração por polarização, quando maior foi o limite de exclusão molecular (Figura 4.2). Este resultado pode dever-se a que um maior tamanho dos poros da membrana permita uma maior acessibilidade à deposição das moléculas, no interior dos poros da

membrana, resultando num bloqueio dos poros mais efectivo, levando a uma diminuição do fluxo de permeado mais acentuada. [46] Foi possível verificar que os efeitos da colmatção da membrana ao longo do tempo (Figura 4.2), para a membrana de 100kDa, resultaram numa decréscimo do teor proteico do permeado obtido ao longo do tempo, enquanto que nos ensaios efectuados com a membrana 5 kDa e 30 kDa tal não foi verificado para o mesmo tempo de ensaio, o que indica que os fenómenos descritos afectam a permeação do soluto para membranas de elevado limite de exclusão molecular. Observou-se que a permeabilidade dos solutos foi superior para membranas de limite exclusão molecular superior, permitindo a obtenção de permeados com um conteúdo proteico superior (Figura 4.2). A média de teor proteico obtido foi de  $0,20 \pm 0,03$ g/L no ensaio com membrana de 5kDa (UF1), de  $0,42 \pm 0,01$ g/L com membrana de 30kDa (UF8) e o ensaio com a membrana de 100kDa (UF9) obteve-se um permeado com 1,25g/L e 0,76g/L em teor proteico.



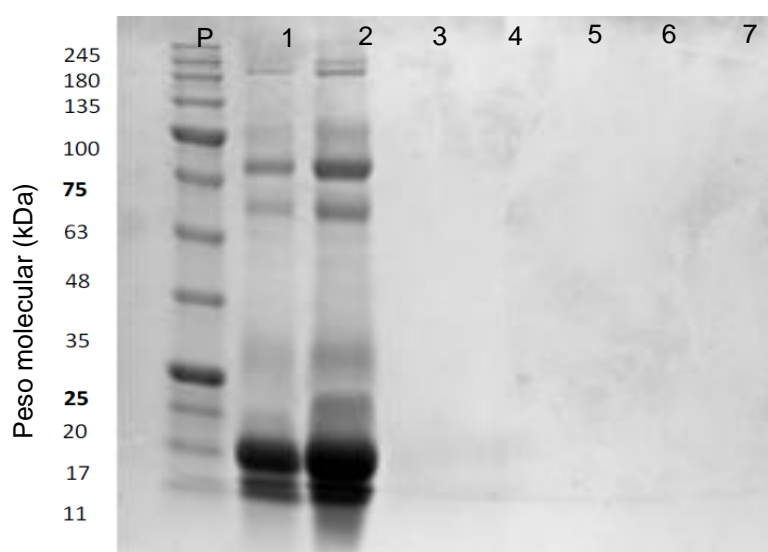
**Figura 4.2.** Fluxo de permeado ao longo do tempo nos ensaios com membrana de 5kDa (UF1), 30kDa (UF8) e 100kDa (UF9), realizados a pressão transmembranar constante. (o fluxo em  $t=0\text{min}$  foi determinado apenas com água desionizada).

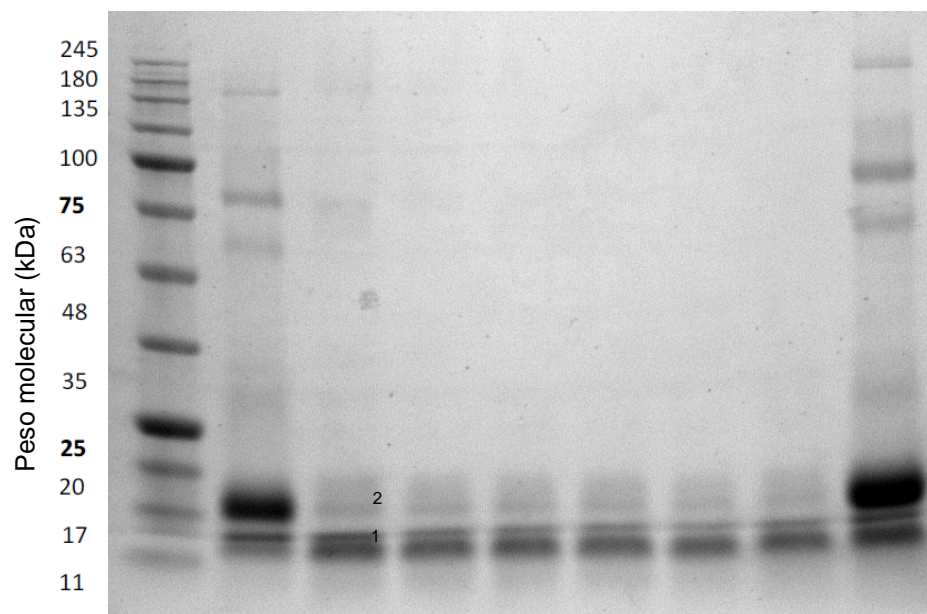
Por determinação da permeabilidade hidráulica, após cada ensaio de ultrafiltração, antes e após da lavagem da membrana foi possível identificar a componente reversível e irreversível que a membrana sofreu por efeito da colmatção da membrana. Comparando os valores de permeabilidade hidráulica obtida após o ensaio antes e após a lavagem da membrana com a permeabilidade hidráulica obtida antes dos ensaios (Tabela 4.2), foi possível verificar que nos ensaios realizados com a membrana de 5kDa (UF1) e 30kDa (UF9) a permeabilidade hidráulica inicial foi recuperada o que indica que não sofreu colmatção da membrana irreversível no decréscimo do fluxo de permeado. Por outro lado, as três membranas apresentaram uma diminuição da permeabilidade antes da limpeza da membrana, tendo-se observado um valor mais acentuado na membrana de 100kDa, possivelmente devido à acumulação de solutos no interior dos poros.

**Tabela 4.2.** Permeabilidade hidráulica inicial ( $L_{pi}$ ), antes ( $L_{pf1}$ ) e após ( $L_{pf2}$ ) a limpeza com membrana de 5kDa (UF1), 30kDa (UF8) e 100kDa (UF9).

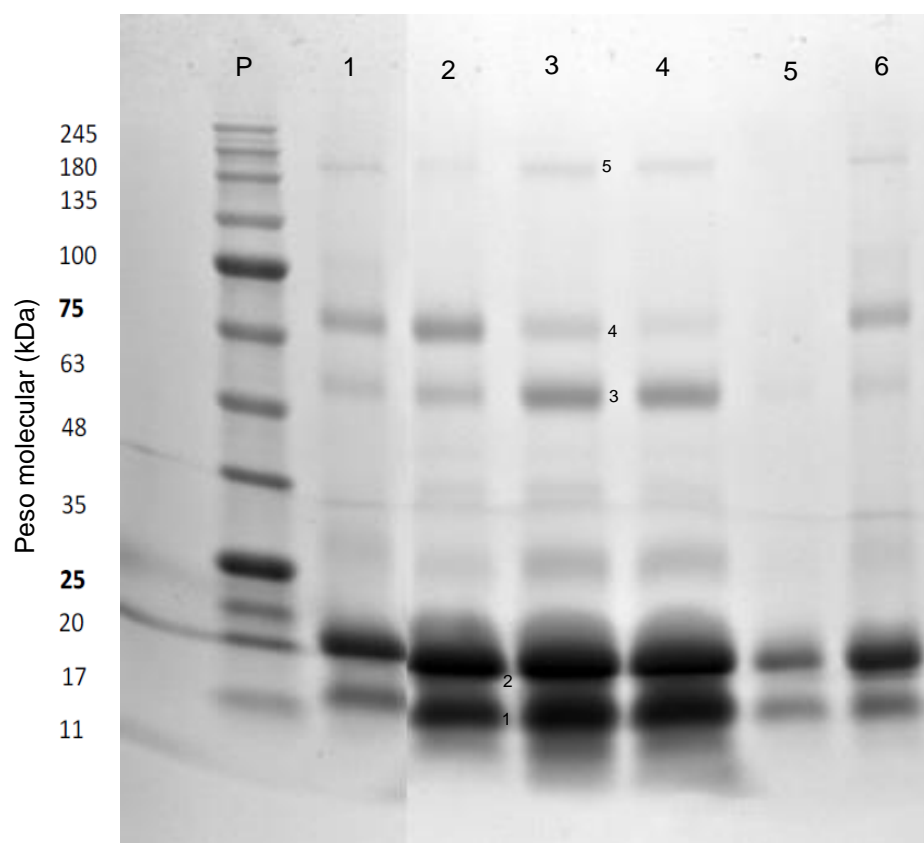
Ensaio	$L_{pi}$ ( $\text{dm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ )	$L_{pf1}$ ( $\text{dm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ )	$L_{pf2}$ ( $\text{dm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ )
UF1 (M5)	13,7	13,5	13,9
UF8 (M30 I)	150,0	121,9	159,9
UF9 (M100)	794,7	49,1	506,8

Como referido inicialmente, o objectivo da aplicação de processos com membranas, foi produzir fracções de soro de leite (permeados) com concentração e tipologia específica de determinado conteúdo proteico. A análise efectuada permitiu concluir que os permeados obtidos no ensaio com membrana de 5kDa (UF1), apenas continham na sua composição péptidos e aminoácidos, uma vez que pela análise do gel de SDS-PAGE não foi identificada nenhuma banda acima dos 11kDa (menor peso molecular da amostra padrão utilizada), e a proteína de menor tamanho do soro de leite tem 14 kDa ( $\alpha$ -LA) (Figura 4.3). Por análise da Figura 4.3 verifica-se que existem duas bandas nos permeados obtidos (bandas 2-8). Pela amostra padrão foi possível identificar o peso molecular das bandas, sendo de 14 kDa e 18 kDa, o que corresponde as proteínas de menor peso molecular a -LA e  $\beta$ -LG, respectivamente. Assim os permeados do ensaio com membrana 30kDa (UF8) além dos péptidos e aminoácidos possuem na sua composição as duas proteínas de menor tamanho do soro de leite ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG) (Figura 4.4). Por último, o ensaio com a membrana 100kDa (UF9) compõe na sua composição toda a tipologia de proteínas do soro de leite ( $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, NI, BSA e IGG) (Figura 4.5). As observações efectuadas vão de encontro ao objectivo inicial pretendido. A identificação das proteínas da alimentação, permeado e retido foi efectuado por SDS-PAGE. A análise resultou na identificação de uma banda proteica com um peso molecular entre 40-48 kDa, a qual não foi possível identificar (NI) (secção 4.2.2)

**Figura 4.3.** Gel de SDS-PAGE do ensaio com membrana 5kDa (UF1). P Amostras padrão; 1: soro de leite não fraccionado; 2- retido no final do ensaio; 3-7: permeados obtidos ao longo do tempo;



**Figura 4.4.** Gel de SDS-PAGE do ensaio com membrana 30kDa (UF8). P Amostras padrão; 1: soro de leite não fracionado; 2-8: permeados obtidos ao longo do tempo; 9: retido no final do ensaio. (1 é referente à  $\alpha$ -LA e 2 à  $\beta$ -LG).



**Figura 4.5.** Gel de SDS-PAGE do ensaio com membrana 100kDa (UF9). P Amostras padrão; 1: soro de leite não fracionado; 2-5: permeados obtidos ao longo do tempo; 6: retido no final do ensaio. (1 é referente à  $\alpha$ -LA, 2 à  $\beta$ -LG, 3 à NI, 4 à BSA e 5 a IG).

O coeficiente de permeabilidade de cada soluto ( $S_i$ ) revelou que, a proteína com 14 kDa ( $\alpha$ -LA) e a de 40 - 48 kDa (NI), em relação a  $\alpha$ -LA era de esperar que fosse elevada uma vez que é a proteína de menor tamanho possuiu assim maior facilidade em permear a membrana. (Tabela 4.3). Por outro lado, a rejeição aparente ( $R_a$ ) da membrana diminuiu com o aumento do limite de exclusão molecular da membrana (Tabela 4.3) Os dados indicam que os fenómenos associados ao declínio do fluxo de permeado têm a capacidade de modificar as características de permeação da membrana [46]. Em particular a acumulação de solutos à superfície da membrana pode reduzir a permeabilidade a alguns solutos.

**Tabela 4.3.** Rejeição aparente, coeficiente de permeabilidade do soluto total e individual, nos ensaios com membranas de 5kDa, 30kDa e 100kDa (UF1, UF8 e UF9 respectivamente).

Ensaio	$R_a$ (%)	$S_t$ (g.g <sup>-1</sup> )	$S_{\beta\text{-LG}}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$S_{\alpha\text{-LA}}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$S_{NI}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$S_{BSA}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$S_{IGG}$ (g.g <sup>-1</sup> )
UF1 (M5)	93	0,01	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
UF8 (M30 I)	90	0,10	0,03	0,26	n.a	n.a	n.a
UF9 (M100)	71	0,29	0,20	0,47	1,51	0,03	0,23

n.a. não aplicável.

#### 4.1.2 Ensaios realizados numa gama de pressões transmembranar

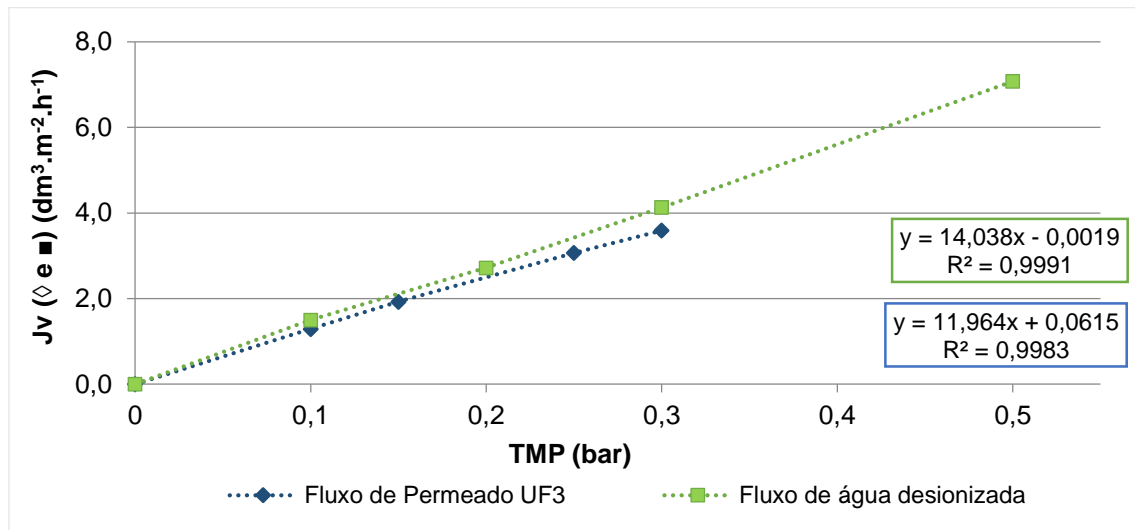
Verificou-se a perda de fluxo de permeado ao longo do tempo, isto poderá ter-se devido ao facto de operar o sistema acima da pressão transmembranar crítica, momento no qual se começa a verificar os efeitos da ocorrência de fenómenos de concentração por polarização e colmatação da membrana. Como tal foi estudado o impacto da pressão transmembranar aplicada no processo e perceber a influência do conteúdo no permeado permeado e no fluxo de permeado. Para tal, procedeu-se ao aumento gradual da pressão transmembranar aplicada para a mesma membrana, isto é, o ensaio foi efectuado a pressão transmembranar constante mas com um aumento progressivo de 0,03 a 0,6bar.

A metodologia descrita foi aplicada usando membranas de 5 kDa (UF3), 10 kDa (UF5) e 30 kDa (UF6), e encontra-se descrita na secção 3.1.1. Os dados relativos ao ensaio UF4 (M10) não foram representados uma vez que apresentavam a mesma tendência que o ensaio UF5 (M10).

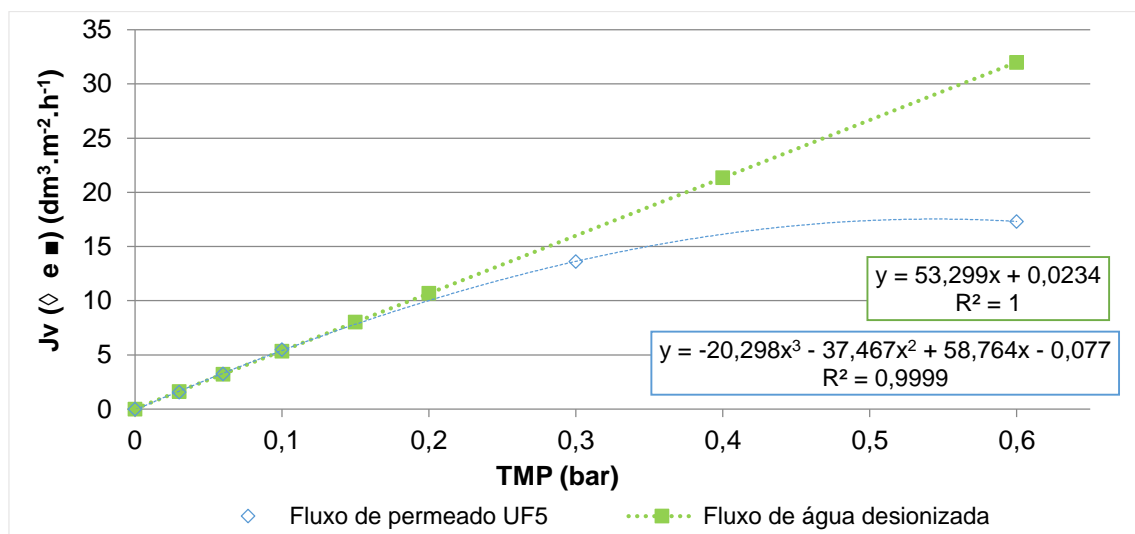
Para determinar a pressão transmembranar e fluxo de permeado crítico para cada membrana efectuou-se o melhor ajuste possível dos pontos experimentais do tipo linear ou exponencial, para o fluxo de permeado de soro de leite é para a água desionizada, e calculou-se o ponto de intersecção entre as duas curvas obtidas para determinação da pressão transmembranar crítica, e o fluxo de permeado crítico.

A pressão transmembranar crítica aumenta com o aumento do limite de exclusão molecular da membrana (Figura 4.6, Figura 4.7 e Figura 4.8). Para o ensaio efectuado com a membrana de 5kDa (UF3) foi de 0,01bar, no ensaio com membrana de 10kDa (UF5) foi de 0,02bar, e para o ensaio com a membrana de 30kDa foi de 0,03bar. Este resultado pode derivar do facto da ocorrência de fenómenos de colmatação da membrana terem um efeito superior em

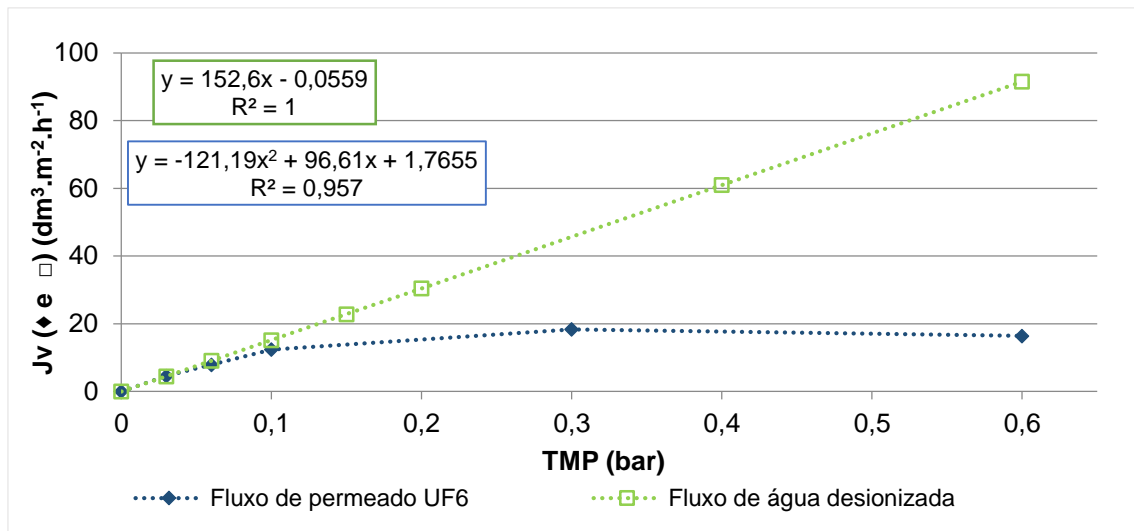
membranas com menor limite de exclusão quando se operar a pressões baixas, uma vez que o poro da membrana é menor, a deposição de solutos à superfície da membrana afecta mais o fluxo de permeado a pressões mais baixas, uma vez que a rejeição de solutos com a membrana de menor limites de exclusão molecular é maior.



**Figura 4.6.** Fluxo de permeado e permeabilidade hidráulica do ensaio com membrana 5kDa em função da pressão transmembranar aplicada (UF3).



**Figura 4.7.** Fluxo de permeado e permeabilidade hidráulica do ensaio com membrana 10kDa em função da pressão transmembranar aplicada (UF5).

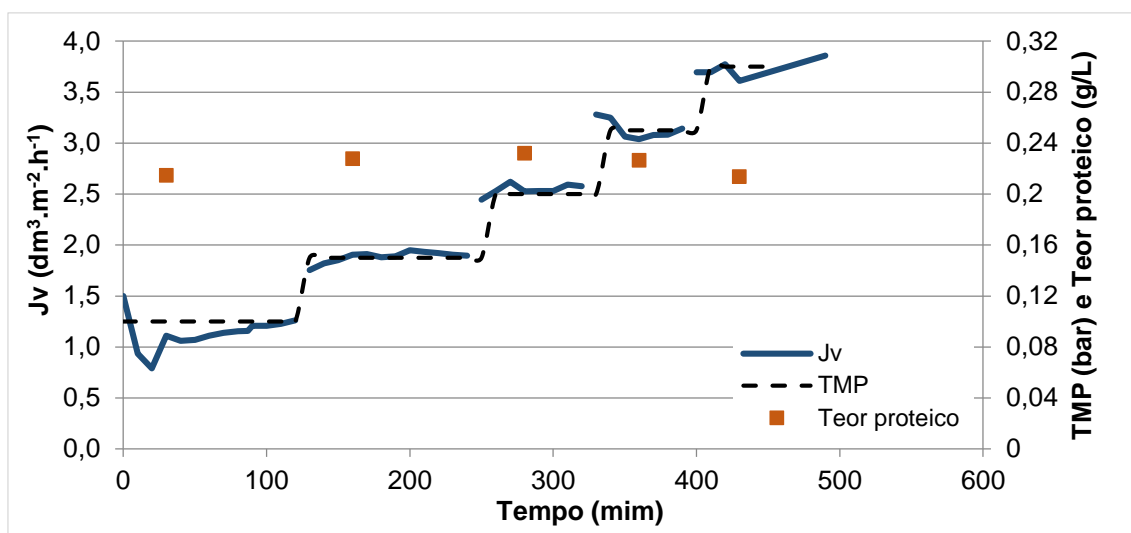


**Figura 4.8.** Fluxo de permeado e permeabilidade hidráulica do ensaio com membrana 30kDa em função da pressão transmembranar aplicada (UF6).

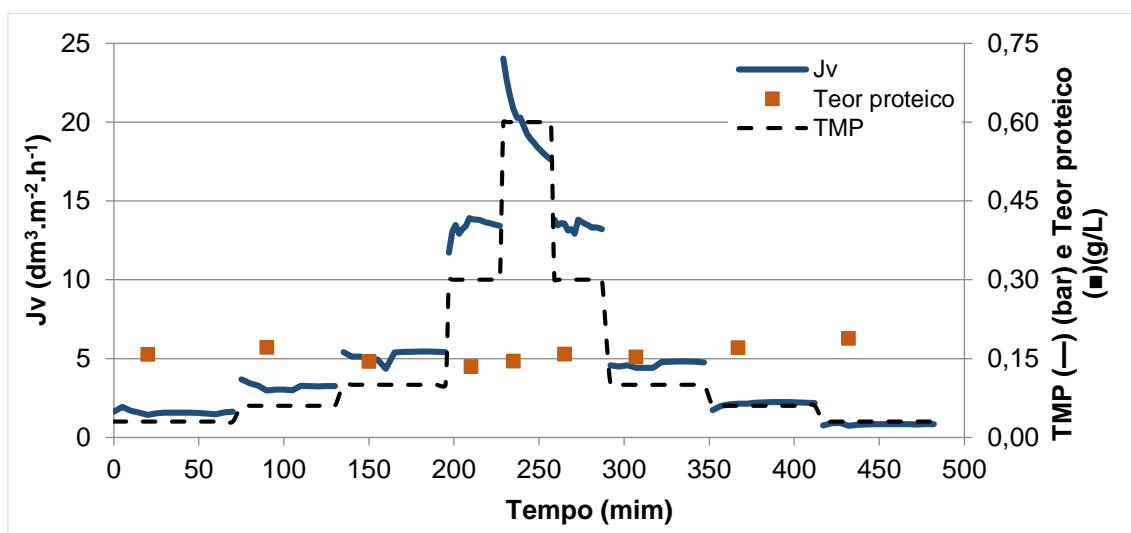
Foi ainda possível determinar o fluxo limite de permeado, isto é, o fluxo a partir do qual este se torna independente da pressão transmembranar aplicada. Observou-se que a pressão partir da qual o fluxo limite foi alcançado, foi tanto maior quanto menor o limite de exclusão molecular da membrana (Figura 4.6, Figura 4.7 e Figura 4.8). No ensaio efectuado com membrana de 30kDa, o fluxo limite foi atingido a partir da aplicação de uma pressão transmembranar de 0,3 bar. Em relação ao ensaio com membranas de 5 kDa o fluxo limite não foi observado e no ensaio com membrana de 10 kDa o fluxo limite foi atingido quando se aplicou uma pressão transmembranar de 0,6 bar.

Além do aumento gradual da pressão transmembranar entre 0,03bar e 0,6bar no mesmo ensaio foi efectuado um decréscimo da pressão de 0,6bar para 0,03bar, nos ensaios com membrana 10 kDa (UF5) e com membrana 30 kDa (UF6), como descrito na secção 3.1.1 (Figura 4.10 e Figura 4.11). Estes ensaios permitiram, além da determinação da pressão transmembranar crítica, realizar uma análise da variação do fluxo de permeado e de permeabilidade de proteína (global e individual) em função de uma gama de pressões transmembranar aplicadas.

Observou-se que o fluxo de permeado foi mais afectado pelos fenómenos de concentração por polarização ou colmatção da membrana, para pressões transmembranares de 0,6 na membrana de 10 kDa (Figura 4.10) e para pressões transmembranares de 0,3 bar ou superior na membrana 30 kDa (Figura 4.11). Relativamente ao ensaio UF3 (M5) o fluxo de permeado teve um decréscimo de cerca de 10% ao longo das pressões aplicadas, comparativamente ao fluxo de permeado com água desionizada para a mesma pressão aplicada (Figura 4.9).

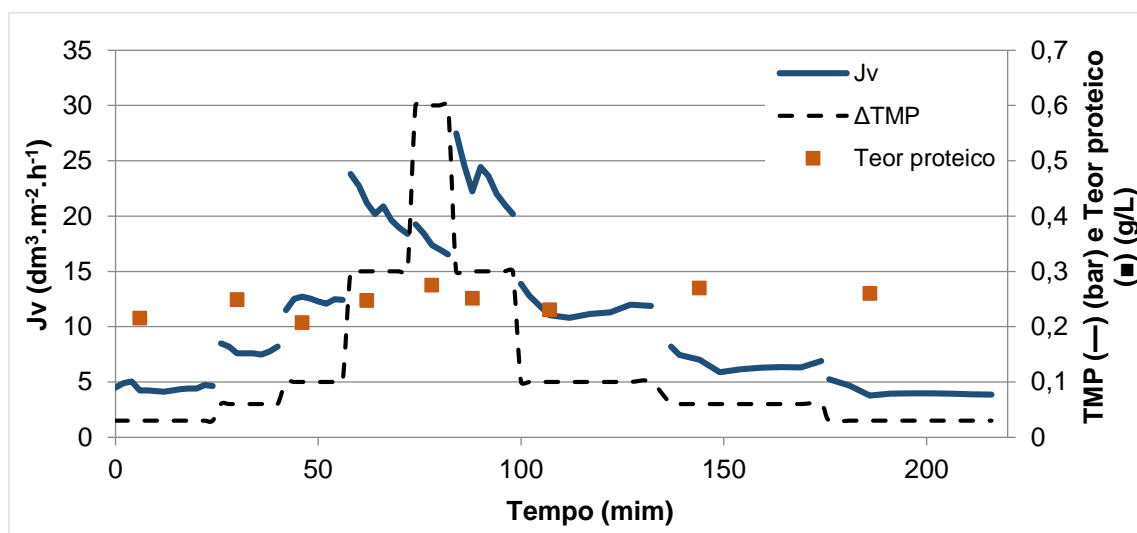


**Figura 4.9.** Fluxo de permeado em função de uma gama de pressão transmembranar aplicada com membrana 5kDa (UF3) (— representa a pressão transmembranar).



**Figura 4.10.** Fluxo de permeado em função de uma gama de pressão transmembranar aplicada com membrana 10kDa (UF5) (— representa a pressão transmembranar).





**Figura 4.11.** Fluxo de permeado em função de uma gama de pressão transmembranar aplicada com membrana 30kDa (UF6) (— representa a pressão transmembranar).

Observou-se novamente um aumento do teor proteico com o aumento do limite da exclusão molecular, comparando as membranas de 5 kDa e 30 kDa não se verificou uma variação significativa da variação do teor proteico à medida que se aplicou as diferentes pressões transmembranares. (Figura 4.9, Figura 4.10 e Figura 4.11) No ensaio com a membrana de 5 kDa (UF3) foi obtido um permeado com um teor proteico de  $0,22 \pm 0,01$  g/L, no ensaio com a membrana de 10 kDa (UF5) tinha  $0,16 \pm 0,02$  g/L e no ensaio com a membrana de 30 kDa foi obtido um  $0,25 \pm 0,02$  g/L. Nos ensaios realizados com a membrana de 5 kDa e de 10 kDa, de limite de exclusão molecular o permeado era constituído por péptidos e aminoácidos, e o ensaio com a membrana de 30 kDa além dos péptidos e aminoácidos era constituído pelas duas proteínas de menor tamanho do soro de leite ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG). No ensaio com a membrana de 30 kDa ocorreu um enriquecimento da proteína  $\alpha$ -LA relativamente à proteína  $\beta$ -LG nos permeados porque a permeabilidade de  $\alpha$ -LA, na mesma membrana é superior. Verificou-se ainda um aumento da concentração das proteínas, nos permeados obtidos, com o aumento da pressão transmembranar aplicada e para a mesma pressão mas num intervalo de tempo superior (2ª parte do processo) a concentração de proteína também aumentou (Tabela 4.4), facto este que se deve à maior acumulação de solutos na membrana com o aumento do tempo de ensaio e provavelmente provocadas pela utilização de pressões mais elevadas, as quais provocam uma maior acumulação de solutos.

**Tabela 4.4.** Concentração de  $\beta$  – LG e  $\alpha$  – LA em função da pressão transmembranar aplicada para a membrana de 30 kDa (UF6).

TMP (bar)	0,03	0,06	0,1	0,3	0,6	0,1	0,03
$\beta$ – LG (g/L)	0,11	0,07	0,10	0,09	0,09	0,07	0,11
$\alpha$ – LA (g/L)	0,14	0,14	0,18	0,16	0,18	0,16	0,14

Comparando os valores de permeabilidade hidráulica após o ensaio antes e após a lavagem da membrana (Tabela 4.5) foi possível verificar que nos ensaios realizados com as membranas de 10kDa (UF5) e 30kDa (UF9) a permeabilidade hidráulica inicial foi recuperada o que indica que não ocorreu componente irreversível no decréscimo do fluxo. Por outro lado, as três membranas apresentaram uma diminuição da permeabilidade antes da limpeza da membrana, correspondente ao fenómeno de colmatação da membrana reversível.

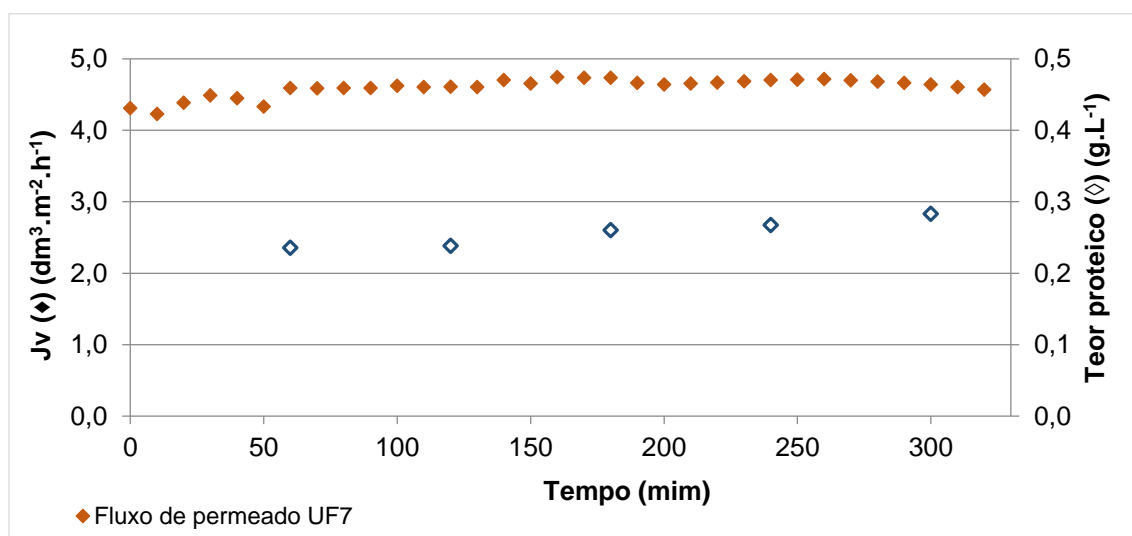
**Tabela 4.5.** Permeabilidade hidráulica inicial, antes e após a limpeza, nos ensaios com a membrana 5kDa (UF3), 10kDa (UF5) e 30kDa (UF6).

Ensaio	$L_{pi}$ ( $\text{dm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ )	$L_{pf1}$ ( $\text{dm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ )	$L_{pf2}$ ( $\text{dm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ )
UF3 (M5)	14,3	11,9	12,9
UF5 (M10)	53,3	51,88	52,8
UF6 (M30 I)	149,3	138,8	150,9

#### 4.1.3 Ensaio realizado abaixo da pressão transmembranar crítica

Uma vez observados os fenómenos associados ao declínio do fluxo de permeado do processo, quando foi aplicada uma pressão superior a pressão transmembranar crítica, foi efectuado um ensaio com a mínima pressão transmembranar 0,03bar, com uma membrana de 30 kDa (UF7). O fluxo de permeado, ao contrário dos ensaios anteriormente apresentados, não apresentam decréscimo do fluxo ao longo do tempo (Figura 4.12), pelo contrário, apresenta um ligeiro aumento, que pode eventualmente estar associado ao aumento da caracter hidrofílico da membrana devido à presença de proteínas na sua superfície. A ausência do decréscimo do fluxo de permeado ao longo do tempo foi atribuída a ausência de fenómenos colmatação da membrana ou concentração de polarização, uma vez que a permeabilidade hidráulica antes da limpeza foi semelhante à inicial e o mesmo acontece com a permeabilidade hidráulica depois da limpeza (Tabela 4.6). A realização do ensaio abaixo da pressão transmembranar crítica possa permite que este seja efectuado por períodos de tempo superiores, sem haver a necessidade de interromper o processo tão frequentemente, para proceder à limpeza do sistema. Apesar da ausência de fenómenos que provocam a diminuição do fluxo de permeado, o fluxo de permeado obtido no ensaio realizado abaixo da pressão transmembranar crítica foi aproximadamente 3 vezes inferior ao ensaio realizado com a mesma membrana mas a uma pressão transmembranar de 0,6bar, o que faz com que o processo de fraccionamento mais lento. E como tal é necessário um período de tempo maior para processar o mesmo volume. Além disto, o permeado obtido era composto por  $0,26 \pm 0,02$  g/L em teor proteico, sendo metade do valor obtido para a mesma membrana (30 kDa) realizado à pressão de 0,6bar (secção 4.1.1). Considerando o teor proteico global presente na solução de alimentação e permeados, a selectividade global do processo foi semelhante em ambos os casos, no entanto a selectividade individual da proteína  $\alpha$ -LA foi 1,3 vezes superior no ensaio realizada pressão transmembranar crítica (UF7) comparativamente ao ensaio realizada à pressão transmembranar de 0,6 bar (UF8), pelo contrário a selectividade de  $\beta$ -LG foi superior no ensaio

realizado a pressão crítica (UF8), o que indica que o ensaio realizado abaixo da pressão crítica permite produzir um permeado mais enriquecido em  $\alpha$ -LA (Tabela 4.7).



**Figura 4.12.** Fluxo de permeado e teor proteico ao longo do tempo no ensaio com membrana de 30kDa (UF7), realizado a pressão transmembranar constante. (o fluxo em t=0min foi determinado apenas com água desionizada).

**Tabela 4.6.** Permeabilidade hidráulica inicial, antes e após a limpeza, no ensaio com membrana de 30 kDa (UF7).

Ensaio	$L_{pi}$ (dm³.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹)	$L_{pf1}$ (dm³.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹)	$L_{pf2}$ (dm³.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹)
UF7 (M30 I)	150,97	151,87	154,59

**Tabela 4.7.** Rejeição aparente, coeficiente de permeabilidade do soluto total e individual, nos ensaios com membrana 30kDa à pressão de 0,3bar UF7 e de 0,6bar (UF8).

Ensaio	$R_a$ (%)	$S$ (g.g⁻¹)	$S_{\beta-LG}$	$S_{\alpha-LA}$	$S_{NI}$	$S_{BSA}$	$S_{IGG}$
UF7 (M30 I)	90	0,10	0,004	0,34	n.a.	n.a.	n.a.
UF8 (M30 I)	90	0,10	0,03	0,26	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: não aplicável

#### 4.1.4 Produção de um permeado com elevador teor proteico e composição em $\alpha$ -LA e $\beta$ -LG

Os estudos anteriores realizados permitiram produzir um permeado com teor proteico e variedade de proteínas menor que a presente na solução de soro de leite não fraccionado, obtido nos ensaios realizados com as membranas de 5 kDa, 10 kDa e 30 kDa. Como descrito na secção 4.2.2 a diminuição do teor proteico ou a menor variedade de proteínas não foi suficiente para igual a produção de VFA e o crescimento celular do reactor efectuado com soro de leite não fraccionado. Para tal, realizou-se um ensaio com a membrana de 100k Da de

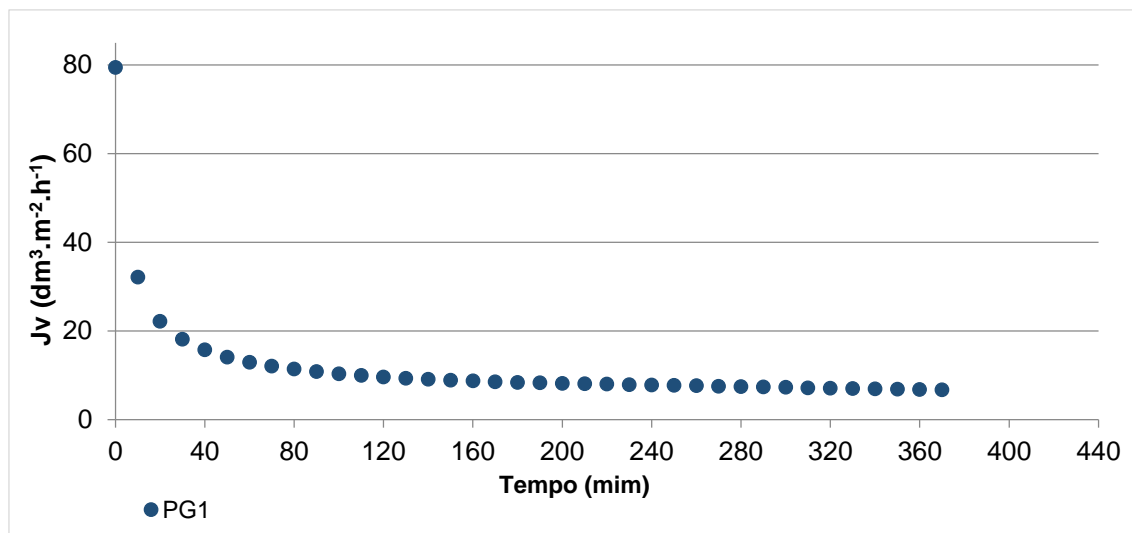
modo a produzir um permeado com maior teor proteico e diversidade por consequência do aumento do limite de exclusão molecular, como descrito na secção 4.1.1. Na secção 4.2.2 (Fermentação acidogénica: soro de leite fraccionado) verifica-se que o processo biológico alcançou uma eficiência superior ao dos ensaios realizados com os permeados obtidos com as membranas de 5 kDa - 30kDa. No entanto, este aumento ainda não foi suficiente para igual a produção de VFA e crescimento celular do ensaio efectuado com soro de leite não fraccionado. Conforme se mostra na secção 4.2.2 (Fermentação acidogénica: soro de leite fraccionado) verificou-se também que quando lhe foi fornecido o permeado obtido com a membrana de 100 kDa, a biomassa não mostrou preferência pelo consumo de uma proteína específica (Tabela 4.17). Uma vez que o processo melhorou a eficiência com o aumento do teor proteico, mas não igualou os parâmetros desejados, o passo seguinte, teve como objectivo otimizar as condições de operação do processo de separação com membranas, com o objectivo de aumentar a permeação das proteínas de menor peso molecular, as quais representam a fracção mais significativa das proteínas do soro de leite. Pretendemos portanto, produzir um permeado com teor proteico semelhante ao obtido com o ensaio realizado com a membrana 100kDa, mas apenas constituído pelas 2 proteínas de menor tamanho ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG), uma vez que o sistema não demonstrou qualquer preferência de uma proteína específica.

Do ponto de vista do processo de separação de membranas utilizado (ultrafiltração), este por si só não permitiu obter uma concentração mais elevada da que já obtida, uma vez que existem fenómenos de concentração de polarização e colmatação da membrana que dificultam a permeação. Como tal, foi aplicado um processo de dia-ultrafiltração (DUF), realizado com uma membrana de 30kDa. A utilização de uma membrana de 30 kDa permite produzir um permeado constituído pelas duas proteínas de menor tamanho do soro de leite ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG), além dos péptidos e aminoácidos, como observado nas secções anteriores. O estudo do impacto do fornecimento ao sistema biológico de um permeado constituído maioritariamente por  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG, permitiu estudar se é possível recuperar ou não as proteínas de maior peso molecular, sem prejudicar o processo biológico e assim produzir um produto de valor acrescentado ao processo de produção de PHA.

A dia-ultrafiltração foi realizada num sistema *dead-end* e com uma linha de água acoplada, de modo a manter o volume dentro da célula contante, como descrito na secção 3.2.4. A conservação do volume constante dentro da célula tem como objectivo reduzir os fenómenos de colmatação da membrana e a diminuição do volume e concentração do retido, e assim melhorar a permeabilidade do soluto e aumentar o teor proteico do permeado obtido. Na secção 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3, verificou-se a realização do ensaio a uma pressão inferior a pressão transmembranar crítica (0,03 bar) permitiu que o sistema de ultrafiltração não fosse afectado por fenómenos de colmatação da membrana ou polarização por concentração. Para compensar este facto, para evitar a degradação das proteínas ao longo do tempo de ensaio e uma vez que seria de esperar menores efeitos de colmatação da membrana ou concentração por polarização optou-se por realizar o ensaio de DUF à pressão transmembranar de 0,6bar. A realização do processo de DUF origina um volume de permeado maior, inerente a adição de

água, necessário para conseguir permear uma quantidade superior de proteínas do que um simples ensaio de UF.

O fluxo de permeado obtido teve um decréscimo entre 92-89% (Figura 4.13). No entanto, apesar volume da célula ter sido mantido constante no decorrer do ensaio, de modo a diminuir a colmatção da membrana e a concentração do retido pela diminuição do volume, o fluxo de permeado no ensaio de DUF teve um maior decréscimo, para o mesmo intervalo de tempo, comparativamente ao ensaio com a membrana 30kDa realizada a mesma pressão (UF8, 0,06bar).



**Figura 4.13.** Fluxo de permeado ao longo do tempo, à pressão transmembranar de 0,6 bar no ensaio dia-ultrafiltração (DUF) com membrana de 30 kDa. (o fluxo em t=0min foi determinado apenas com água desionizada).

Comparando os valores de permeabilidade hidráulica após o ensaio e após a lavagem da membrana (Tabela 4.8) foi possível verificar que no ensaio realizado com a membrana de 30kDa no processo de dia-ultrafiltração, a permeabilidade hidráulica inicial foi recuperada o que indica que não ocorreu componente irreversível no decréscimo do fluxo, associado aos fenómenos de colmatção da membrana.

**Tabela 4.8.** Permeabilidade hidráulica inicial e após a limpeza, no ensaio com membrana de 30 kDa no ensaio de dia-ultrafiltração.

Ensaio	$L_{pi}$ (dm³.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹)	$L_{pf2}$ (dm³.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹)
DUF (M30 II)	132,9	135,3

A rejeição aparente da membrana, ao final do ensaio para o teor proteico total do permeado obtido, no ensaio de dia-ultrafiltração, foi de 99% enquanto que no ensaio de ultrafiltração com a membrana de 30 kDa realizado a 0,06bar foi de 90%, o que indica que o processo de dia-ultrafiltração teve uma maior selectividade.

O permeado obtido continha 0,51g/L em teor proteico. A desvantagem associada ao processo foi o elevado volume de permeado obtido, o volume inicial da alimentação foi de 150mL e foram adicionados 657mL de água desionizada, o que perfaz que o número de volumes de diafiltração necessários para obter o teor proteico desejado fosse de 4,4. Como tal, foi necessário concentrar o volume de permeado e para isso foi escolhido o processo de osmose inversa, realizado com uma membrana SW30 (Filmtec, DOW).

O processo de osmose inversa foi realizado na mesma unidade e a pressão transmembranar controlada como descrito na secção 3.1.4. A pressão utilizada foi de 28 bar e conseguiu-se uma concentração de 3,5 vezes superior ao teor proteico inicial obtido no processo de ultrafiltração, obtendo assim um permeado com 1,82 g/L em teor proteico, e uma concentração 1,3 vezes inferior ao do soro de leite não fraccionado. A rejeição do processo foi de 99,7%, o teor proteico do permeado foi aproximadamente zero e a concentração da lactose foi semelhante ao do soro de leite inicial, o que indica que todos os componentes iniciais foram retidos na membrana. O fluxo de permeado ao longo do tempo, teve um perfil decrescente, tendo uma diminuição de 79% relativamente a permeabilidade hidráulica inicial obtida para esta membrana, do fluxo inicial determinado para a água desionizada.

## 4.2 Fermentação acidogénica

O objectivo desta secção é verificar o impacto da remoção parcial de proteínas, tendo em vista a sua valorização, no processo biológico. Teve-se especial atenção ao impacto sobre o crescimento biológico, uma vez que as proteínas são a única fonte de azoto fornecida aos microorganismo assim como também o impacto na produção de VFA que são o produto da fermentação, usados posteriormente como precursores da produção de PHAs.

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados da etapa experimental da fermentação acidogénica do soro de leite e do soro de leite bruto. O soro de leite fraccionado refere-se ao soro obtido nos processos de separação com membranas (secção 4.1) e o soro de leite bruto refere-se àquele que não sofreu qualquer pré-tratamento.

Nesta etapa experimental foram realizados 3 conjuntos de ensaios (A, B e C). A designação adoptada para representar cada ensaio é constituído por uma letra, referente ao conjunto ao qual o ensaio pertence (A, B ou C) e por um número que representa o número no conjunto de ensaios, por exemplo A.1 referir-se-á ao ensaio número 1 do conjunto de ensaios A. O número zero refere-se ao reactor alimentado com soro de leite bruto, também denominados de reactor de referência.

A fermentação acidogénica realizou-se num reactor fechado, em condições anaeróbias, a pH 6, à temperatura controlada de 37°C e com um volume total de 20mL, como descrito na secção 3.2. Cada conjunto de ensaios foi realizado nas mesmas condições e com o mesmo inóculo, mas os conjuntos de ensaio foram realizados em tempos diferentes. O conjunto de ensaios A e B foram realizados com um intervalo de tempo de 77 dias, o B e C com 98 dias, e no total, entre A e C decorrerem 175 dias. O inóculo foi o mesmo para todos os ensaios, tendo sido preservado num recipiente fechado, sem oxigénio e refrigerado entre cada conjunto de ensaios. Com o objectivo de anular o efeito de possíveis alterações da actividade do inóculo, uma vez que este era constituído por uma cultura microbiana mista que pode sofrer alterações ao longo do tempo, todos os reactores alimentados com soro de leite fraccionado, quando comparados, foram reportados ao valor do reactor com soro de leite bruto, do respectivo conjunto de ensaios (A.0, B.0 e C.0).

### 4.2.1 Fermentação acidogénica: soro de leite bruto

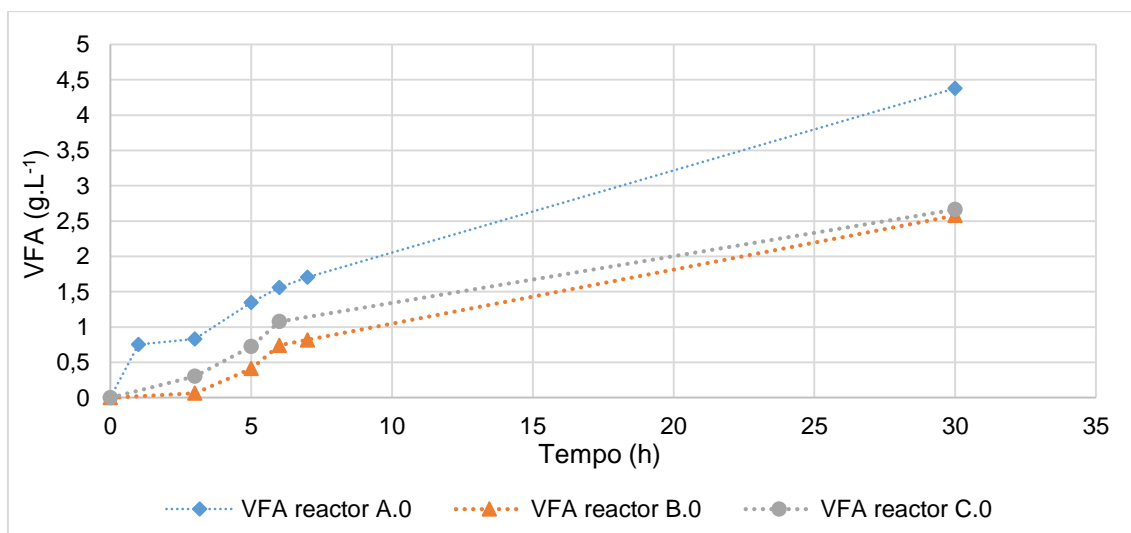
Nesta secção foi estudada a resposta do inóculo quando alimentado com soro de leite bruto. As condições iniciais dos reactores A.0, B.0 e C.0, encontram-se descritas na Tabela 4.9.

**Tabela 4.9.** Condições iniciais em VSS, lactose e proteína dos ensaios A.0, B.0 e C.0.

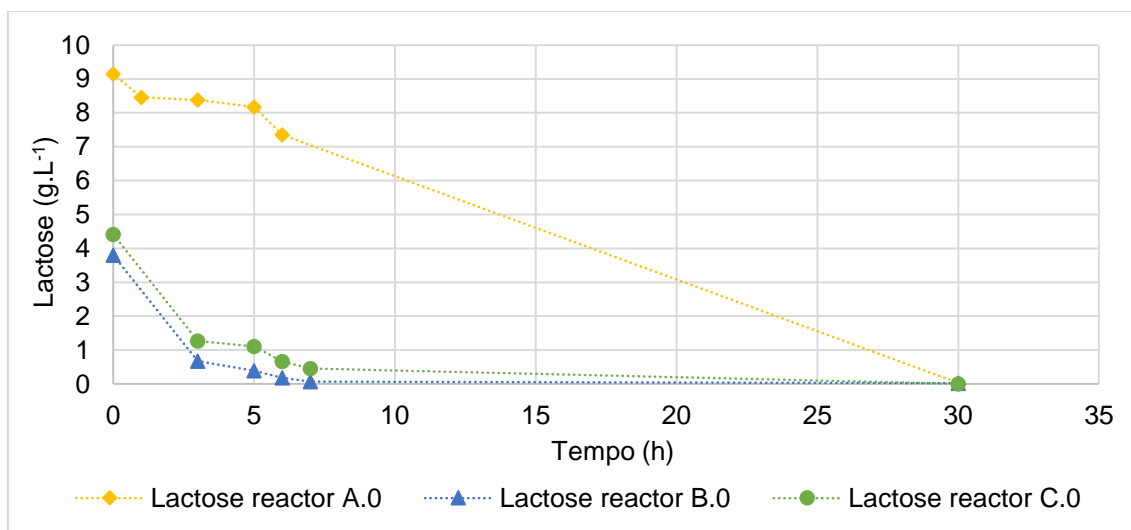
Reactor	Volume de soro de leite no volume de trabalho (mL)	VSSi (g.L <sup>-1</sup> )	VSSf (g.L <sup>-1</sup> )	Lactose (g.L <sup>-1</sup> )	Proteína (g.L <sup>-1</sup> )
A.0	14	2,0	3,4	9,1	2,2
B.0	8	2,8	4,5	3,8	0,9
C.0	8	2,4	2,7	4,4	1,0

O volume de soro de leite fornecido nos conjuntos de ensaios B e C foi pouco mais de metade do volume fornecido ao conjunto de ensaios A, e por consequência a quantidade de lactose e proteína também diminuíram na mesma proporção nestes ensaios. A redução do volume de soro de leite em B e C resultou da necessidade de ajustar o volume utilizado nos reactores de referência, aos volumes de soro de leite fraccionado obtidos no processo de separação com membranas.

A produção de VFA nos reactores B.0 e C.0 foi cerca de metade da produção de VFA do reactor A.0, no final das 30 horas do processo (Figura 4.14), sendo que o reactor A.0 produziu cerca de 4,5 g/L e os reactores B.0 e C.0 2,5 g/L. Como seria espectável a produção de VFA diminuiu com a diminuição da quantidade de lactose e proteína. Os reactores A.0, B.0 e C.0 apresentaram tendências de produção de VFA idênticos ao longo do tempo. No final das 30 horas do processo observou-se a exaustão da lactose fornecida (Figura 4.15).



**Figura 4.14.** Produção de VFA nos reactores A.0, B.0 e C.0.



**Figura 4.15.** Consumo de lactose nos reactores A.0, B.0 e C.0.



Verificou-se a diminuição do crescimento da biomassa ao longo do tempo, visto que do ensaio A.0 para o C.0 passou de 74% a 28% (Figura 4.15). O menor crescimento verificado no reactor C.0 pode ser indício de perda de actividade ou alteração da população que compunha o inóculo, uma vez que os ensaios foram realizados com uma distância temporal de 175 dias e 98 dias dos reactores A.0 e B.0, respectivamente. A perda de actividade do inóculo pode estar associado a possíveis alterações da composição da população microbiana ao longo do tempo, dado que foi usada uma cultura microbiana mista que pode sofrer alterações ao longo do tempo apesar de ser acondicionada a 4°C entre os ensaios. A diminuição do crescimento celular da biomassa, ao longo dos ensaios e consequentemente ao longo do tempo, suporta a necessidade de se executar um reactor de referência, em todos os conjuntos de ensaios, para avaliar as alterações da performance da biomassa.

Verificou-se que cerca 50-70% da lactose consumida ao final das 30h, foi usada para produzir VFA ( $Y_{VFA/lactose}$ ) (Tabela 4.10). Apesar do reactor A.0 apresentar um comportamento semelhante ao final das 30 horas, às 6 horas de processo 96% da lactose consumida havia sido convertida em VFA, enquanto nos reactores B.0 e C.0 20% havia sido convertida.

Os resultados obtidos indicam que, ao final das 30h, uma maior percentagem da lactose consumida, foi canalizada para a produção de VFA do que para o crescimento celular, uma vez que o rendimento de VFA em lactose (0,50-0,70) foi superior ao rendimento da biomassa em lactose consumida (0,13-0,50)

**Tabela 4.10.** Crescimento da biomassa ( $\Delta X$ ), rendimento de produção de VFA ( $Y_{VFA/lactose}$ ) e biomassa ( $Y_{X/lactose}$ ) em relação à lactose consumida nos reactores A.0, B.0 e C.0.

Reactor	$\Delta X$ (% mássica) <sup>a</sup>	$Y_{VFA/lactose}$ t=6h (g.g <sup>-1</sup> )	$Y_{VFA/lactose}$ t=30h (g.g <sup>-1</sup> )	$Y_{X/lactose}$ t=30h (g.g <sup>-1</sup> )
A.0	74	0,87	0,48	0,16
B.0	64	0,19	0,68	0,49
C.0	28	0,22	0,60	0,13

<sup>a</sup>  $\Delta X = (VSS_{f, t=30h} - VSS_i) / VSS_i$  em (g.g<sup>-1</sup>);

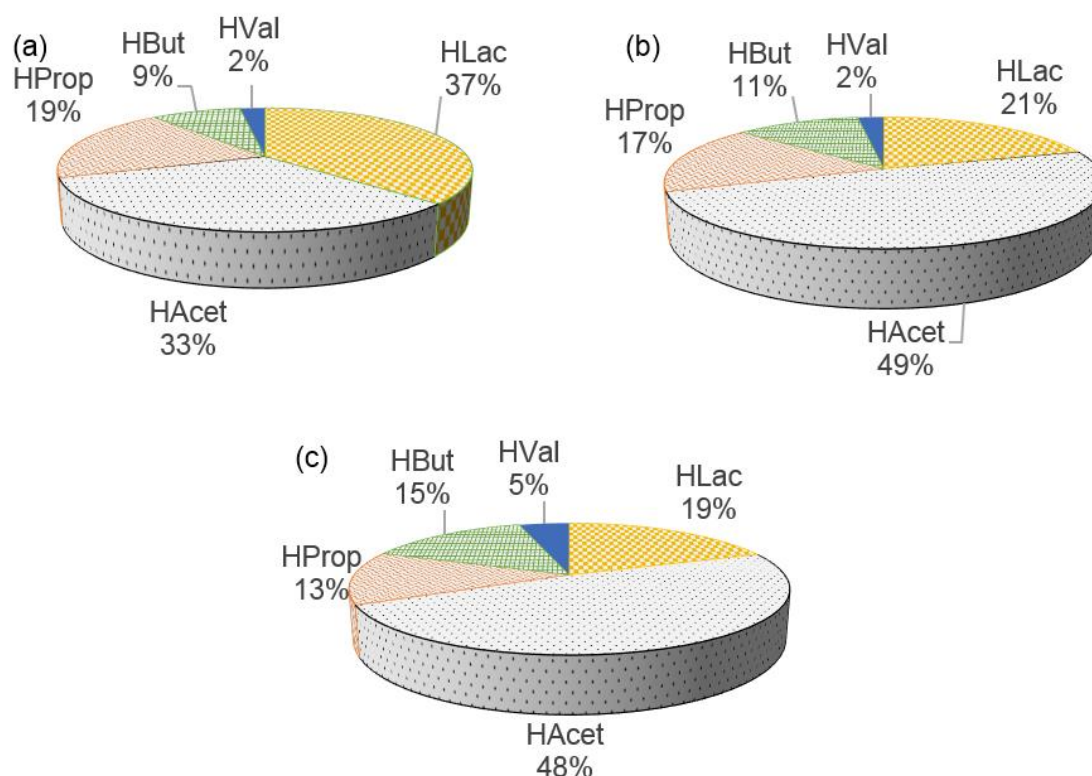
A biomassa teve uma maior velocidade específica de consumo de lactose ( $-q_{lactose}$ ) quando foi fornecida uma menor quantidade de lactose, ou seja nos ensaios B.0 e C.0 (Tabela 4.9 e Tabela 4.11). A velocidade específica de produção de VFA foi superior A.0, que possuía mais lactose e que produziu maior quantidade de VFA, como era espectável. No reactor A.0, ao qual foi fornecida uma quantidade de lactose superior, observou-se uma fase de adaptação metabólica (fase *lag*) maior em relação ao consumo de lactose, comparativamente aos reactores B.0 (Figura 4.15 e Tabela 4.9). A velocidade específica de produção de VFA foi superior no reactor A.0, o que indica que a biomassa estava mais activa no primeiro conjunto de ensaios efectuados.

**Tabela 4.11.** Velocidades específicas de consumo de proteína ( $-q_{\text{prot}}$ ) e lactose ( $-q_{\text{lactose}}$ ) e velocidade de produção de VFA ( $q_{\text{VFA}}$ ) nos ensaios A.0, B.0 e C.0.

Reactor	$-q_{\text{prot}} \text{ (g.g}^{-1}\text{X.h}^{-1}\text{)}$	$-q_{\text{lactose}} \text{ (g.g}^{-1}\text{X.h}^{-1}\text{)}$	$q_{\text{VFA}} \text{ (g.g}^{-1}\text{X.h}^{-1}\text{)}$
A.0	0,03	0,02	0,13
B.0	0,04	0,32	0,05
C.0	0,01	0,33	0,06

O perfil de ácidos orgânicos produzidos ao final das 30 horas de análise, foi semelhante nos reactores B.0 e C.0 (Figura 4.16 b e c). O ácido produzido em maior quantidade foi o acetato (HAcet) que compunha cerca de 49% da percentagem total de VFA produzidos, segue-se o lactato (HLac), o propionato (Hprop) e o butirato (Hbut) com 20%, 15% e 11%, respectivamente. O valerato (Hval) foi o ácido produzido em menor quantidade, com uma componente de apenas 3%. O perfil obtido está de acordo com estudos anteriormente realizados por Duque *et al* (2013) [3], com o mesmo soro de leite bruto num reactor membranar anaeróbio, sendo que neste estudo se obteve o acetato em maior proporção (61%) seguindo-se o propionato (13%) e o butirato (12%), e em pequenas quantidades o valerato (3%). Relativamente ao perfil de VFA produzidos no reactor A.0 (Figura 4.16 a), o lactato é o maior componente com 37%, seguindo-se o acetato, propionato e butirato com 33%, 19% e 9%, e em menor quantidade o valerato com 2%. No entanto, dado que o reactor A.0 teve condições iniciais diferentes dos reactores B.0 e C.0, em termos de quantidade de lactose, pode-se concluir que a perda de actividade da biomassa não foi devida à mudança de organismos, uma vez que organismos diferentes produzem diferentes perfis de VFA, e verificou-se que os sistema responde da mesma forma, apesar de não ter sido feita análise microscópica, da biomassa, para determinação da composição microbiana da biomassa.

É sabido que na etapa de produção de PHA existe uma relação directa entre os ácidos orgânicos fornecidos e a composição do polímero obtido [1] [3] [21]. Isto é, a composição do PHA produzido depende da composição da corrente rica em VFA, que é produzida na etapa de fermentação acidogénica.



**Figura 4.16.** Perfil de ácidos gordos produzidos no final de 30 horas nos ensaios (a) A.0, (b) B.0 e (c) C.0 (percentagem em base mássica).

Verifica-se que no final das 30 horas de processo apenas foram consumidas 60-80% das proteínas fornecidas (Tabela 4.12). O que implica que existe uma fracção da proteína que não foi consumida pela biomassa, suscitando a possibilidade de um ajuste do teor de proteínas fornecido ao sistema. A recuperação da fracção das proteínas possibilita que estas possam vir a ser comercializadas melhorando economicamente o processo. Estudos anteriormente realizados por Duque *et. al* (2013) [3] reforçam a possibilidade de recuperar uma fracção das proteínas do soro de leite. Neste estudo, foi efectuada a fermentação acidogénica de soro de leite bruto, num reactor membranar anaeróbio em contínuo, e foi verificado que 26-30% da proteína fornecida não foi consumida biologicamente.

**Tabela 4.12.** Consumo de proteínas no final das 30 horas do processo nos ensaios A.0, B.0 e C.0.

Reactor	Proteínas consumidas $\Delta t=30h$ (g.L <sup>-1</sup> )
A.0	1,6
B.0	0,8
C.0	0,6

#### 4.2.2 Fermentação acidogénica: soro de leite fraccionado

Através do estudo anterior foi possível concluir que o sistema biológico não consome todo a teor proteico fornecido. A recuperação de um certo teor proteico pode representar uma mais-valia para o processo de produção de VFA e consequente produção de PHA, em que o soro de leite é usado como matéria-prima. A recuperação deste teor proteico pode permitir uma produção de concentrados proteicos economicamente viáveis. Existe no entanto a necessidade de verificar que a recuperação de uma fracção proteica não afecta o processo de fermentação acidogénica, visto que as proteínas são a única fonte de azoto para o crescimento biológico.

Por forma a analisar a viabilidade deste procedimento, foi estudado o impacto do fraccionamento do teor proteico do soro de leite, alimentação do processo, no comportamento da biomassa e em particular na produção de VFA. Assim, nesta fase do estudo, o sistema biológico passou a ser alimentado por soluções de soro de leite previamente sujeito a processos de separação com membranas, tal como a ultrafiltração. Como descrito na secção 4.1, o processo de separação com membranas permitiu recuperar e reduzir parte do teor proteico, componente do soro de leite. De realçar que as condições de fraccionamento foram seleccionadas por forma a não afectar a composição de açúcares (lactose) e sais presentes no soro de leite, mas apenas o teor proteico do mesmo.

A alimentação de cada reactor foi caracterizada em concentração de proteína inicial, o teor de proteína total, e a percentagem relativa de cada proteína determinada por electroforese (SDS-PAGE) (Tabela 4.13)

A composição do soro de leite bruto determinada está de acordo com aquela descrita na literatura. [30] [31] Foi obtida uma fracção de 32% em  $\alpha$ -LA, 53% em  $\beta$ -LG, 7,8% em BSA, 4,5% em NI e 0,3% em IGG. A proteína NI (não identificada) corresponde a uma fracção de proteína não identificada com um peso molecular entre 40-48 kDa. A composição percentual das proteínas não é totalmente igual àquela referida na literatura, uma vez que a sua composição depende do processo de produção, das variações sazonais, da espécie produtora e da sua alimentação. [23] Além das proteínas descritas na Tabela 4.13 o soro de leite também é composto por lactoferrina (cerca de 0,1g/l no soro de leite) [31]. Apesar disso esta proteína não foi detectada pelo método de análise efectuado, SDS-PAGE, devido a sua baixa concentração. Analogamente, o método de análise também não permitiu quantificar os péptidos do soro de leite.

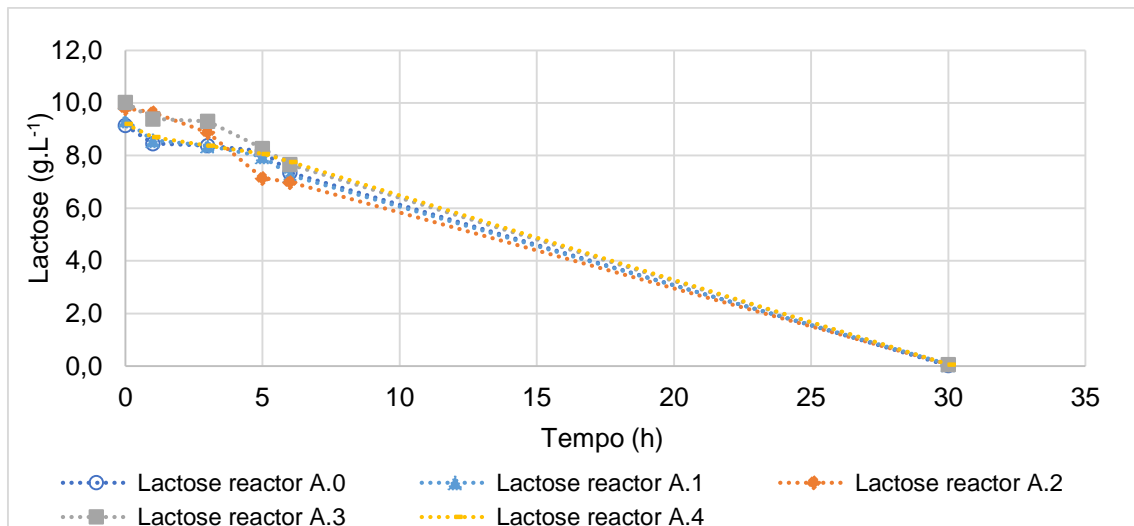
**Tabela 4.13.** Composição da alimentação inicial (lactose, teor proteico e percentagem relativa de cada proteína (base mássica)) utilizada em cada ensaio.

	A.0	A.1	A.2	A.3	A.4	B.0	B.1	B.2	B.3	C.0	C.1
Lactose (g.L <sup>-1</sup> )	9,14	9,33	9,80	10,02	9,21	3,80	2,93	4,09	4,08	4,41	3,61
Teor proteico (g.L <sup>-1</sup> )	2,22	0,14	0,16	0,22	0,30	0,99	0,50	0,35	0,30	1,00	0,57
α-LA (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32,0	29,7	43,8	59,8	32,5	76,5
β-LG (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	53,3	58,6	35,1	18,1	53,2	23,5
NI (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,9	5,8	9,8	15,8	4,2	0,0
BSA (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,5	5,1	3,1	2,2	9,1	0,0
IGG (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2	0,7	1,0	2,4	0,4	0,0
Permeado (membrana/ensaio)	-	M5 UF2	M5 UF3	M10 UF4-	M30 I UF8	-	M100 UF9 t=5min	M100 UF9 t=40min	M100 UF9 T=80min	-	M30 II DUF 1º dia

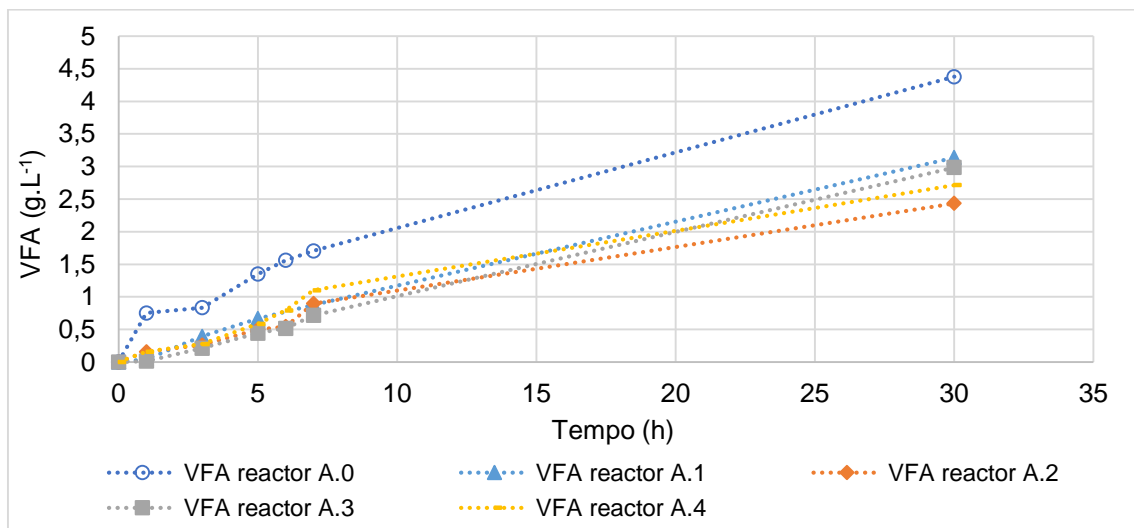
n.d.: não detectado

No conjunto de ensaios A.1, A.2, A.3 e A.4, foi removido cerca de 90% do teor proteico, corresponde à situação em que alimentação era apenas constituído por aminoácidos, péptidos e proteínas de menor tamanho do soro de leite (α-LA e β-LG), no caso no caso do reactor A.4. O teor proteico da alimentação, foi obtido nos processos de separação com membranas, com membranas de limite de exclusão molecular baixo (5 kDa – 30 kDa), descrito na secção 4.1.

Analogamente ao sucedido no reactor de referência (A.0), também nos reactores alimentados com soro de leite fraccionado existiu uma exaustão de lactose no final das 30 horas do processo (Figura 4.17). No entanto, a produção de VFA sofreu uma redução de 36% em relação à conseguida quando se utilizou soro de leite bruto (A.0). No final de 30 horas de processo foram obtidos aproximadamente 3 g/L de VFA em cada reactor do conjunto de ensaios A (A.1, A.2, A.3 e A.4), em vez dos 4,4 g/L obtidos no reactor de referência A.0, realizado com soro de leite bruto (Figura 4.18).

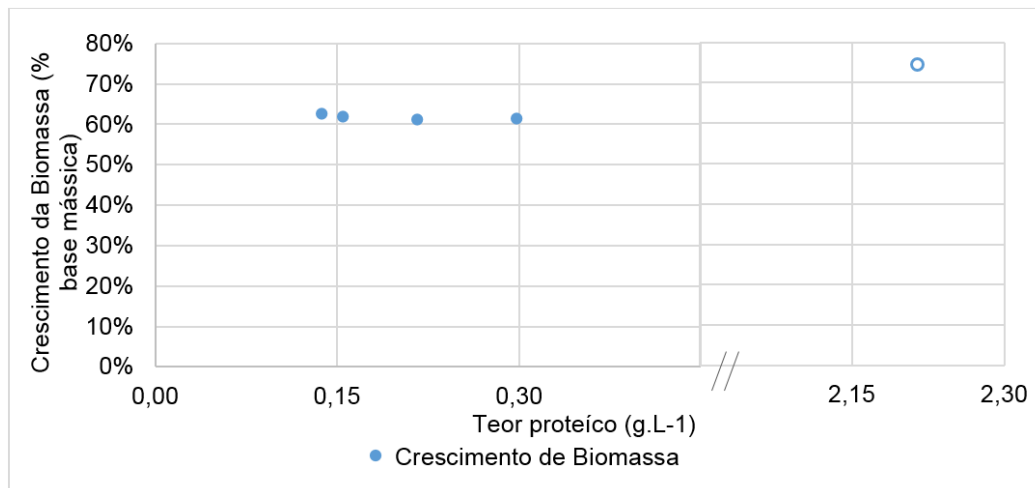


**Figura 4.17.** Consumo de lactose no conjunto de ensaios A (A.0 A.1, A.2, A.3 e A.4).



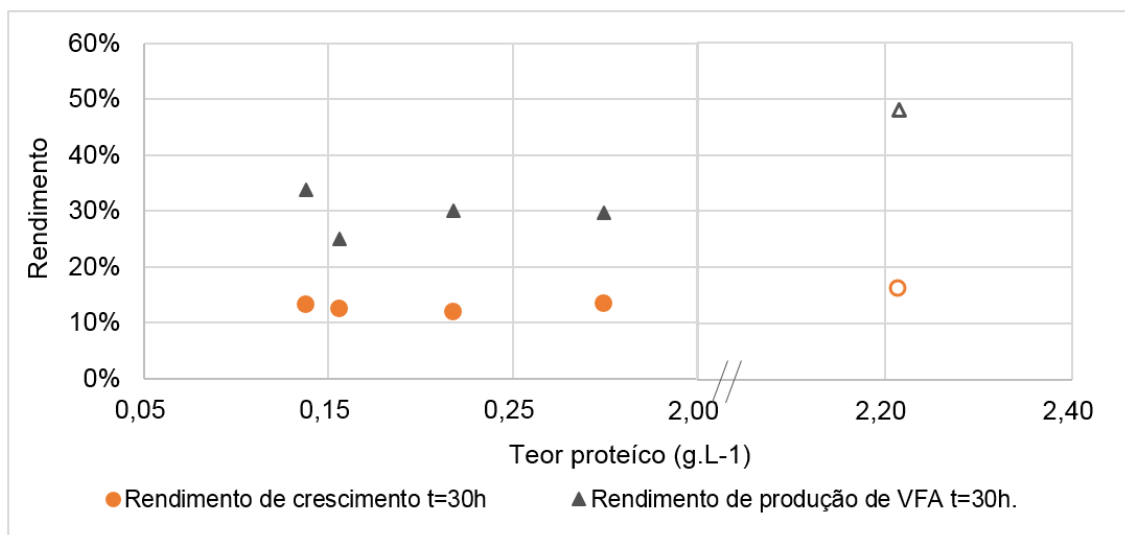
**Figura 4.18.** Produção de VFA conjunto de ensaios A (A.0 A.1, A.2, A.3 e A.4)

Os resultados relativos ao crescimento de biomassa mostram que uma redução de aproximadamente 90 % do teor proteico conduziu a uma diminuição de aproximadamente 20% do crescimento em relação ao verificado no reator de referência (A.0) (Figura 4.19). Os dados sugerem que apesar dos reactores possuírem 13% do teor de proteína total do soro de leite bruto, a biomassa conseguiu usar o teor proteico fornecido, constituído maioritariamente por péptidos e aminoácidos livres, para o crescimento, devido à sua fácil acessibilidade. No entanto, o aumento da concentração do teor proteico, na gama de concentrações estudadas para os ensaios A.1, A.2, A.3 e A.4, parece não ter significado no crescimento da biomassa, uma vez que o seu valor permanece inalterado com um aumento de concentração entre 0,14g/L e 0,30 g/L de material proteico (Figura 4.19). Os resultados indicam que a produção obtida no conjunto de ensaios A.1, A.2, A.3 e A.4, poderá ter estado limitada pela baixa quantidade de azoto (proteínas), e portanto elevada razão lactose/proteína que levou a limitação da produção de VFA ou crescimento de biomassa.



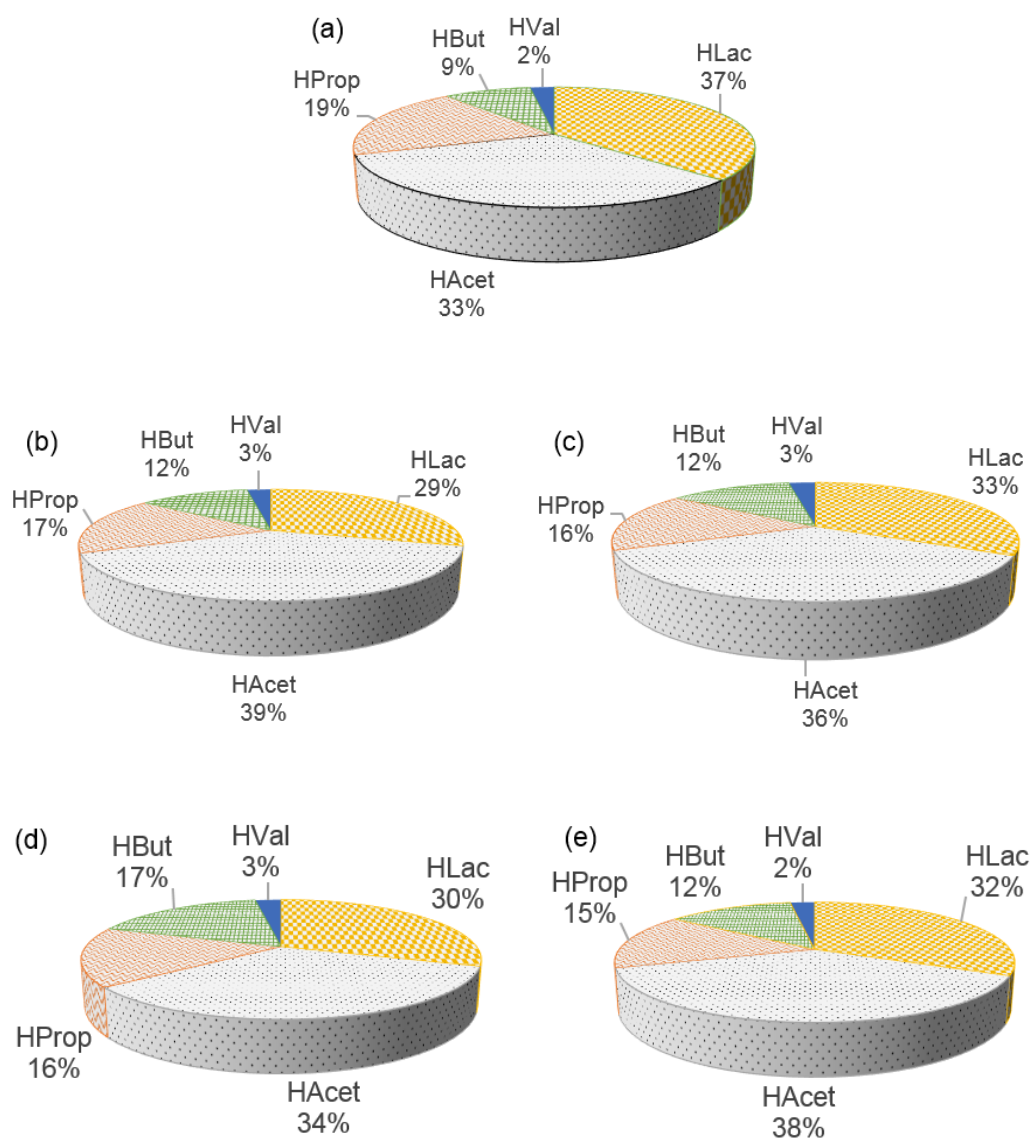
**Figura 4.19.** Crescimento da Biomassa em função do teor proteico fornecido no conjunto de ensaios A. (○ representa o reactor com soro de leite bruto).

Os rendimentos de produção de VFA e rendimento de crescimento obtido com soro de leite fraccionado também sofreram uma redução de 18% e 3%, respectivamente, em relação aos rendimentos conseguidos com o soro de leite bruto (Figura 4.20).



**Figura 4.20.** Rendimento de produção de VFA e rendimento de crescimento no final de 30h, em função do teor proteico fornecido no conjunto de ensaios A. (Δ e ○ representam o reactor com soro de leite bruto).

Os perfis de ácidos gordos produzidos, ao final das 30 horas do processo, nos reactores A.1, A.2, A.3 e A.4 são semelhante ao reactor de referência (A.0) apesar da redução do teor proteico fornecido, sendo que apenas foi verificada uma pequena redução da composição de lactato de 6% (Figura 4.21). Quer isto dizer, que a redução total de VFA por limitação de azoto ocorre à custa de cada um dos VFA de igual modo. Assim, o ácido produzido em maior quantidade é o acetato com  $37 \pm 2\%$ , de seguida o lactato com  $31 \pm 1\%$ , o propionato com  $16 \pm 1\%$ , o butirato com  $13 \pm 3\%$  e por último o acetato com apenas  $3 \pm 0\%$



**Figura 4.21.** Perfis de ácidos gordos produzidos ao final de 30 horas nos ensaios (a) A.0, (b) A.1 e (c) A.2, (d) A.3 e (e) A.4.

Da quantidade total de proteínas fornecidas, apenas 64% foram consumidas ao final das 30 horas do processo (Tabela 4.14). Apesar da remoção do teor proteico inicial do soro de leite, o sistema apenas consumiu 36% do teor proteico fornecido, valor semelhante ao obtido no reactor de referência A.0.

**Tabela 4.14.** Consumo de proteínas no final das 30 horas do processo nos ensaios A.1, A.2, A.3 e A.4.

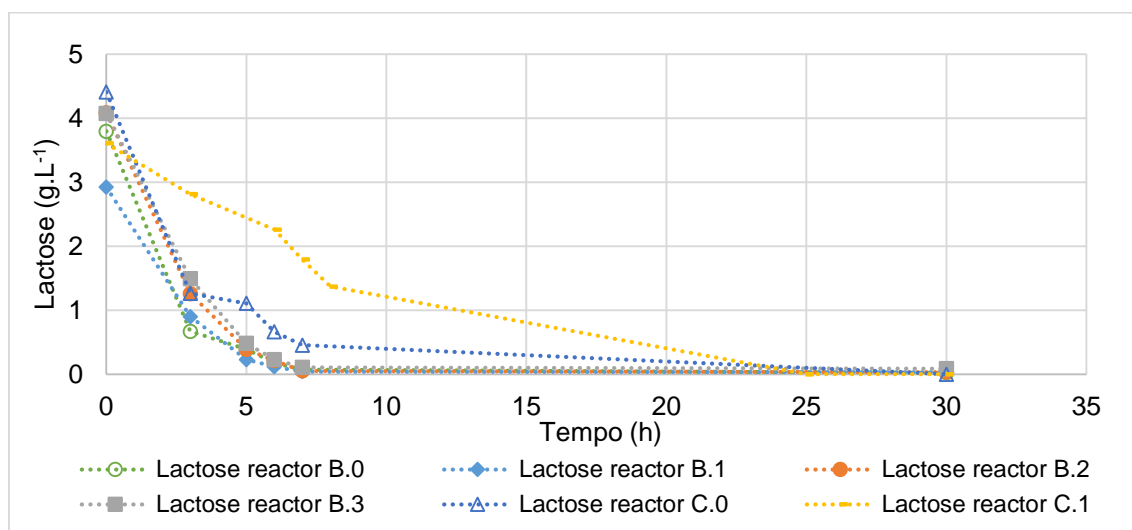
Reactor	Proteínas consumidas para $\Delta t=30h$ (g.L <sup>-1</sup> )
A.1	0,11
A.2	0,09
A.3	0,12
A.4	0,20



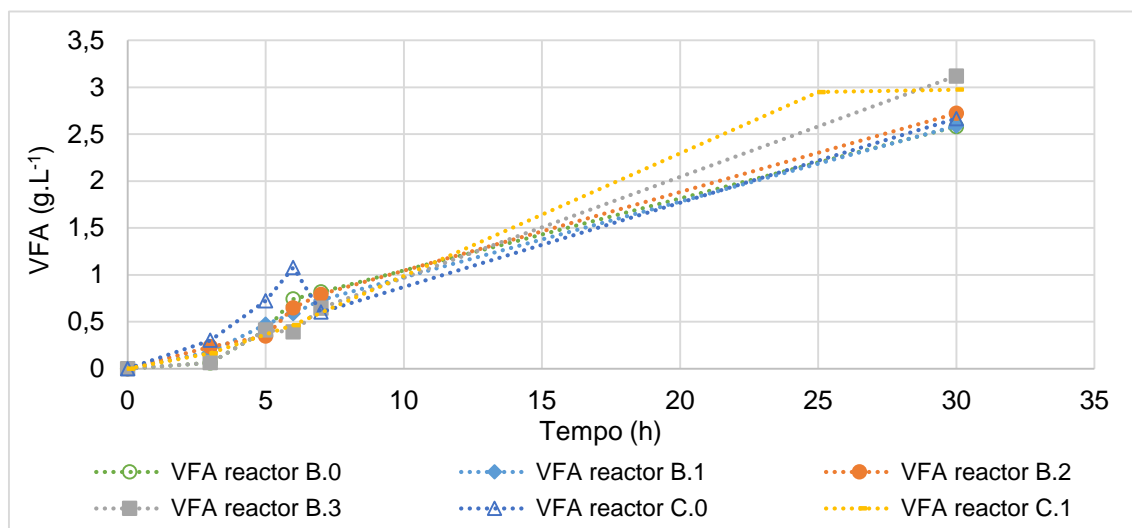
Em suma, nos ensaios do conjunto A alimentados com soro de leite fraccionado, com uma redução de 90% em teor proteico, obtiveram-se 64% da produção de VFA e 85% crescimento celular, em relação ao reactor de referência, logo ficaram aquém da eficiência soro de leite bruto. Deste modo, foram aplicadas condições de ultrafiltração que permitiram a obtenção de permeados com um maior teor proteico, conforme descrito na secção 4.1. Os permeados obtidos foram utilizados como alimentação dos reactores dos conjuntos de ensaio B e C.

Os conjuntos de ensaios B e C foram realizados com uma redução de 40-60% do teor total de proteína do soro de leite bruto (Tabela 4.13). Nos conjuntos de ensaios B e C, realizados com soro de leite fraccionado, não só o teor proteico foi superior no conjunto de ensaios A, como também a diversidade de proteínas foi superior, uma vez que foram aplicadas membranas com limite de exclusão molecular de 100 kDa nos reactores B.1-3 e de 30 kDa no reactor C.1, em oposição à membrana usada para obtenção do permeado dos ensaios A (membrana 5 kDa- 30 kDa).

Verificou-se a exaustão da lactose ao final das 30 horas em todos os reactores B.1-3 e C.1 (Figura 4.22). Relativamente à produção de VFA, ao final das 30 horas, verificou-se um acréscimo de 10%, em relação aos reactores de referência realizados com soro de leite bruto. No final de 30 horas do processo foram obtidos cerca de 3 g/L de VFA nos reactores B.1-3 e C.1 (Figura 4.23).

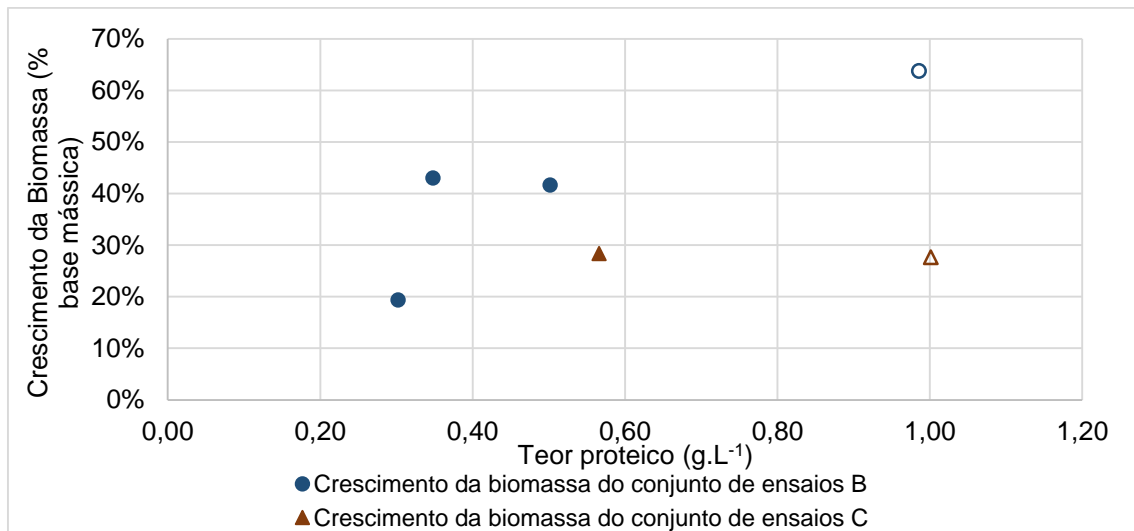


**Figura 4.22.** Consumo de lactose nos conjuntos de ensaios B e C ao final de 30 horas.



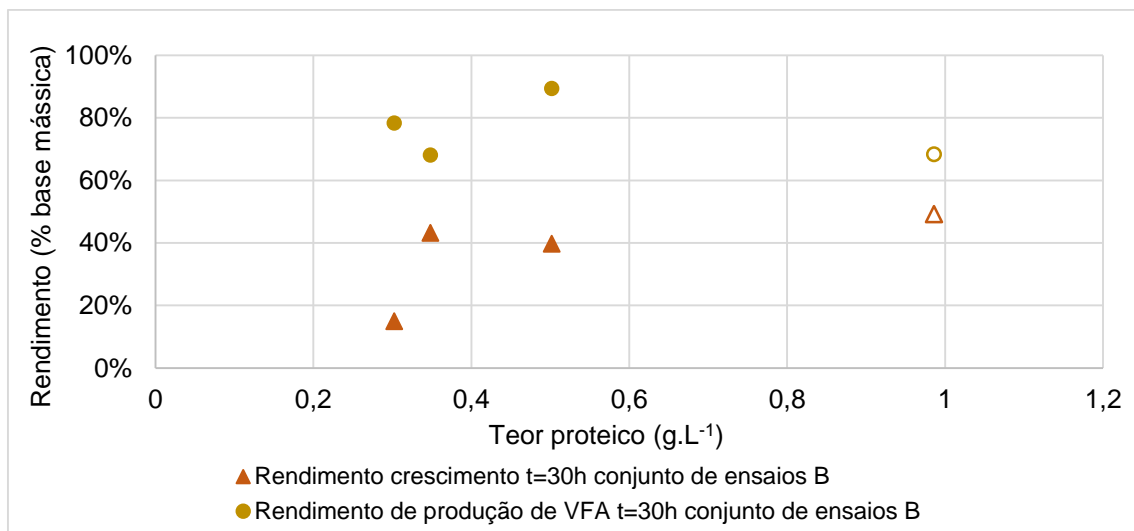
**Figura 4.23.** Produção de VFA nos conjuntos de ensaios B e C ao final de 30 horas.

Relativamente ao crescimento de biomassa, os resultados mostram que uma redução de 40% do teor proteico, efectuada no reactor C.3, consegue igualar o crescimento celular da biomassa ao crescimento do reactor de referência, C.0, efectuado com soro de leite bruto (Figura 4.24). Os dados sugerem que apesar do reactor possuir 60% do teor proteico do soro de leite, a biomassa terá conseguido aceder com mais facilidade ao azoto necessário para o crescimento celular, uma vez que o teor proteico era constituído maioritariamente pelas proteínas de menor peso molecular ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG) (Tabela 4.13). Por outro lado, o conjunto de ensaios B, alimentados com soro de leite fraccionado, constituídos por 30-50% do teor proteico do soro de leite bruto, conduziu a uma diminuição de 30-70% do crescimento em relação ao verificado no reactor de referência (B.0). A composição do soro de leite fraccionado nos reactores B.1-3 incluiu toda a gama de proteínas do soro de leite (Tabela 4.13), de modo que a biomassa não terá tido tanta facilidade em aceder a fonte de azoto como no reactor C.1, e como tal não terá conseguido crescer. Os resultados sugerem que com 35-50% de teor proteico e elevada gama de proteínas, a biomassa sofreu uma redução de 30% do crescimento celular em relação ao soro de leite bruto, atingindo um patamar de crescimento a partir da composição de 0,30g/L de teor proteico.



**Figura 4.24.** Crescimento da Biomassa em função do teor proteico fornecido nos conjuntos de ensaios B e C. ( $\Delta$  e  $\circ$  representa o reactor com soro de leite bruto).

De salientar que, para o conjunto de ensaios B, os rendimentos de produção de VFA, foram 15-30% superiores, em relação aos rendimentos conseguidos quando de utilizou soro de leite bruto (Figura 4.25). Por outro lado, o rendimento de crescimento atingiu um patamar, a partir da concentração de 0,30 g/L, tal como observado no crescimento celular (Figura 4.24). Portanto, uma redução de 50-70% de teor proteico, em relação ao soro de leite bruto, foi suficiente para igual rendimento de produção de VFA, mas não o consumo de lactose para crescimento celular.



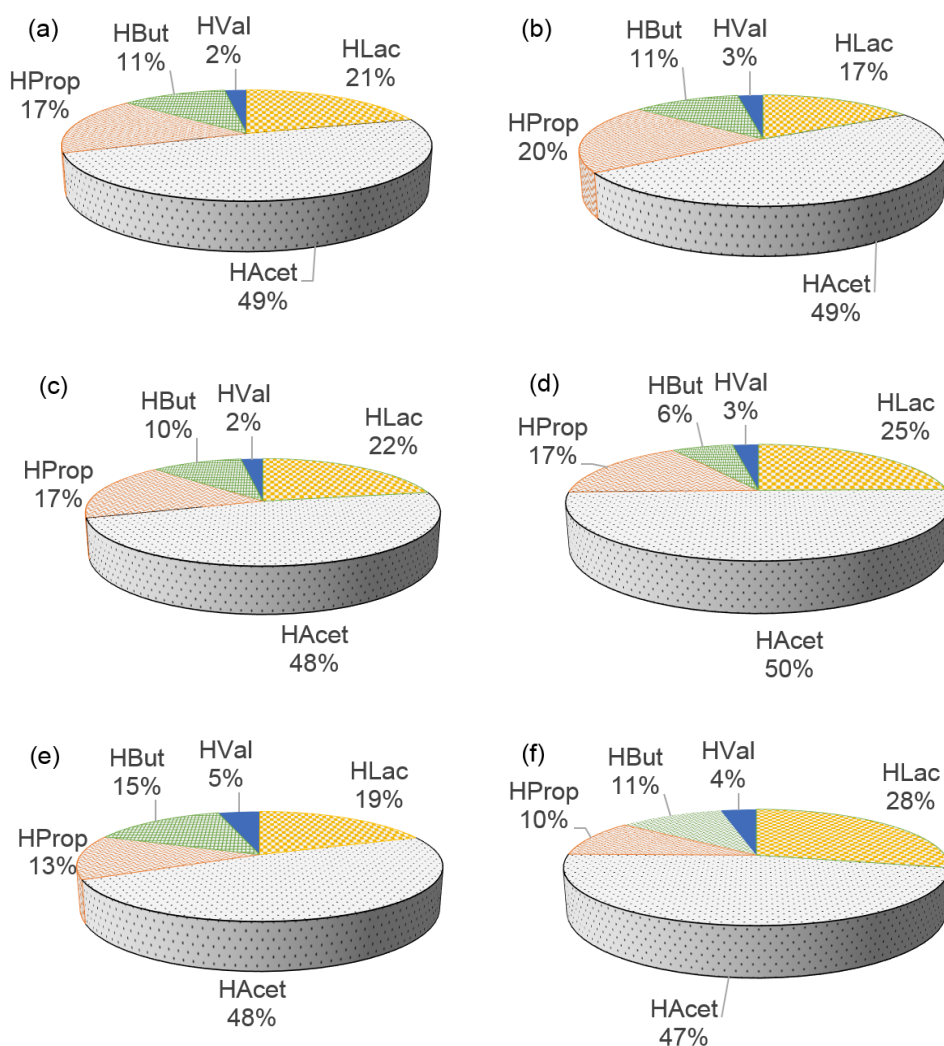
**Figura 4.25.** Rendimento de produção de VFA e rendimento de crescimento para t=30h do conjunto de ensaios B. ( $\Delta$  e  $\circ$  representam o reactor com soro de leite bruto).

Relativamente ao reactor C.1, os valores dos rendimentos de produção de VFA e crescimento um aumento de 35% e 32%, respectivamente, em relação aos rendimentos conseguidos quando se utilizou soro de leite bruto (Figura 4.20).

**Tabela 4.15.** Rendimento de produção de VFA e rendimento de crescimento para  $t=30h$  do conjunto de ensaios C.

Reactor	$Y_{VFA/lactose\ t=30h} (g.g^{-1})$	$Y_{X/lactose\ t=30h} (g.g^{-1})$
C.0	0,60	0,13
C.1	0,81	0,18

Ao final das 30 horas, para os conjuntos de ensaios B e C, realizados com soro de leite fraccionado, foram obtidos perfis semelhantes aos produzidos nos respectivos reactores de referência, efectuados com soro de leite bruto. Os resultados indicam, mais uma vez, que a redução total de VFA ocorre à custa de cada um dos VFA de igual modo. Verifica-se que o acetato é o componente produzido em maior quantidade com  $48\pm1\%$  da produção total de VFA, seguindo-se o lactato com  $23\pm5\%$ , propionato  $16\pm4\%$ , o butirato com  $10\pm2\%$  e em menor quantidade o valerato com apenas  $3\pm1\%$  da produção total de VFA (Figura 4.26).

**Figura 4.26.** Perfis dos ácidos gordos produzidos no final de 30 horas nos ensaios (a) B.0, (b) B.1, (c) B.2, (d) B.3, (e) C.0 e (f) C.1.

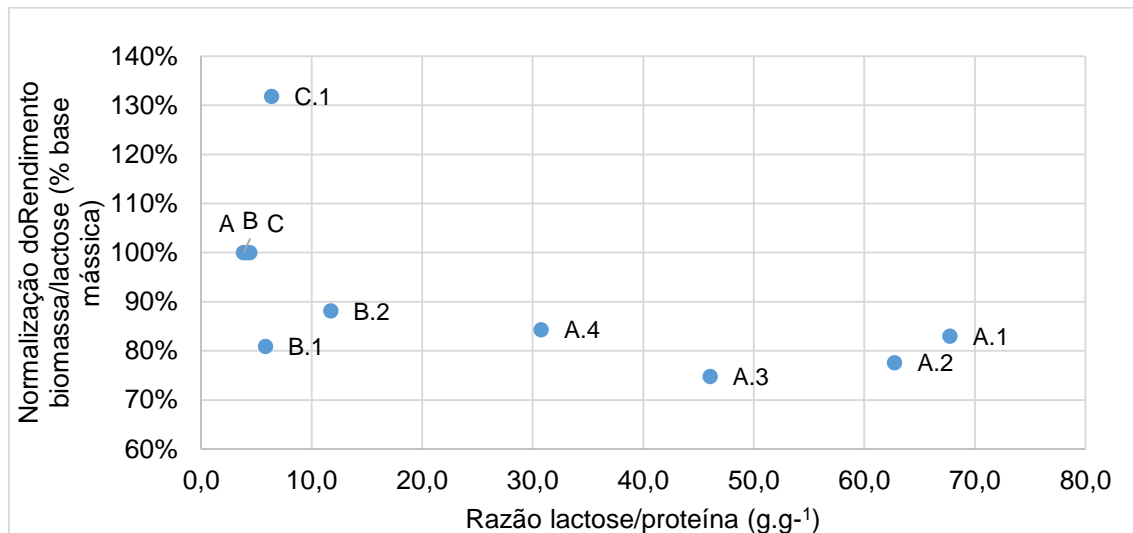
Da quantidade total de proteínas fornecidas foram consumidas cerca de 80% no conjunto de ensaios B e 60% no conjunto de ensaios C, ao final das 30 horas do processo. Apesar do aumento do teor proteico de 6-13% do conjunto de ensaios A (relativamente ao soro de leite bruto), para 30-57% em teor proteico nos conjuntos dos ensaios B e C, o sistema não conseguiu consumir a proteína na totalidade (Tabela 4.16). Os dados indicam que a proteína não é consumida, uma vez que ao final das 30 horas existiu uma exaustão da lactose, que pode consequente possa ter limitado o sistema, por inexistência da fonte de carbono.

**Tabela 4.16.** Consumo de proteínas no final das 30 horas do processo nos ensaios B.1, B.2, B.3 e C.1.

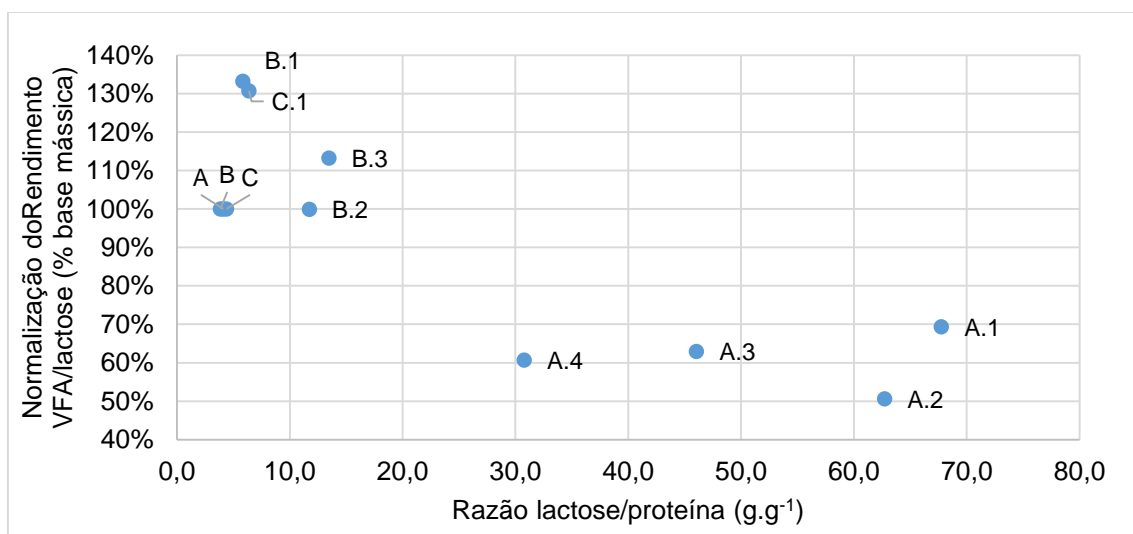
Reactor	Proteínas consumidas para $\Delta t=30h$ (g.L <sup>-1</sup> )
B.1	0,48
B.2	0,30
B.3	0,28
C.1	0,32

Uma vez que a razão em teor proteico e lactose afecta o sistema, é necessário perceber que condições iniciais de lactose e teor proteico optimizam o processo, a fim de maximizar a produção de VFA e o crescimento celular da biomassa. Verifica-se que quanto maior a razão lactose/ proteína mais baixo são os rendimentos de crescimento e produção de VFA em relação ao valor de referência (Figura 4.25 e Figura 4.26). A normalização, em relação ao reactor de referência, do rendimento de crescimento, apresentou uma tendência decrescente com o aumento da razão lactose/ proteína, uma vez que quanto maior for a razão lactose/proteína menor é o teor proteico fornecido e consequentemente menor teor de azoto é disponibilizado ao sistema (Figura 4.27). No entanto, observou-se um aumento do rendimento de biomassa nos reactores A.1 e A.2, em que a alimentação foi composta maioritariamente por péptidos e aminoácidos. Consequentemente o aumento do rendimento de crescimento verificado nos reactores A.1 e A.2, pode ter-se devido a ausência das proteínas de maior tamanho no soro de leite fraccionado alimentado ao sistema, possibilitando assim uma maior acessibilidade à fonte de azoto fornecida. O reactor C.1 possuiu uma razão de lactose/proteína de 6,4 e o batch B.1 de 5,8. No entanto, apesar da proximidade da razão entre eles, o reactor C.1 teve um rendimento de crescimento, normalizado para o valor de referência, 30% superior. O reactor B.1 conteve na sua composição uma gama variada de pesos molecular de proteínas, enquanto o reactor C.1 apenas incluiu as de menor tamanho ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG) (Tabela 4.13), possibilitando assim uma maior acessibilidade da fonte de azoto. Em suma, o sistema conseguiu aceder com maior facilidade a fonte de azoto, quanto lhe foi fornecido uma alimentação com teor proteico de baixo peso molecular. Por outro lado, os reactores B.1 e C.1 obtiveram o maior valor em rendimento de produção de VFA, normalizado para o reactor de referência (Figura 4.28). Assim, foi possível concluir que a razão lactose/proteína do reactor C.1 (6,4) juntamente com a composição de baixo peso molecular do teor proteico fornecido permitiu

uma optimização da produção de VFA e do crescimento celular. Em contrapartida, como referido anteriormente, os resultados do conjunto de ensaio A, indicam que estes possam ter sido limitados pela falta de azoto, uma vez que apenas possuíram 60% do rendimento de produção de VFA, normalizado para o reactor de referência.



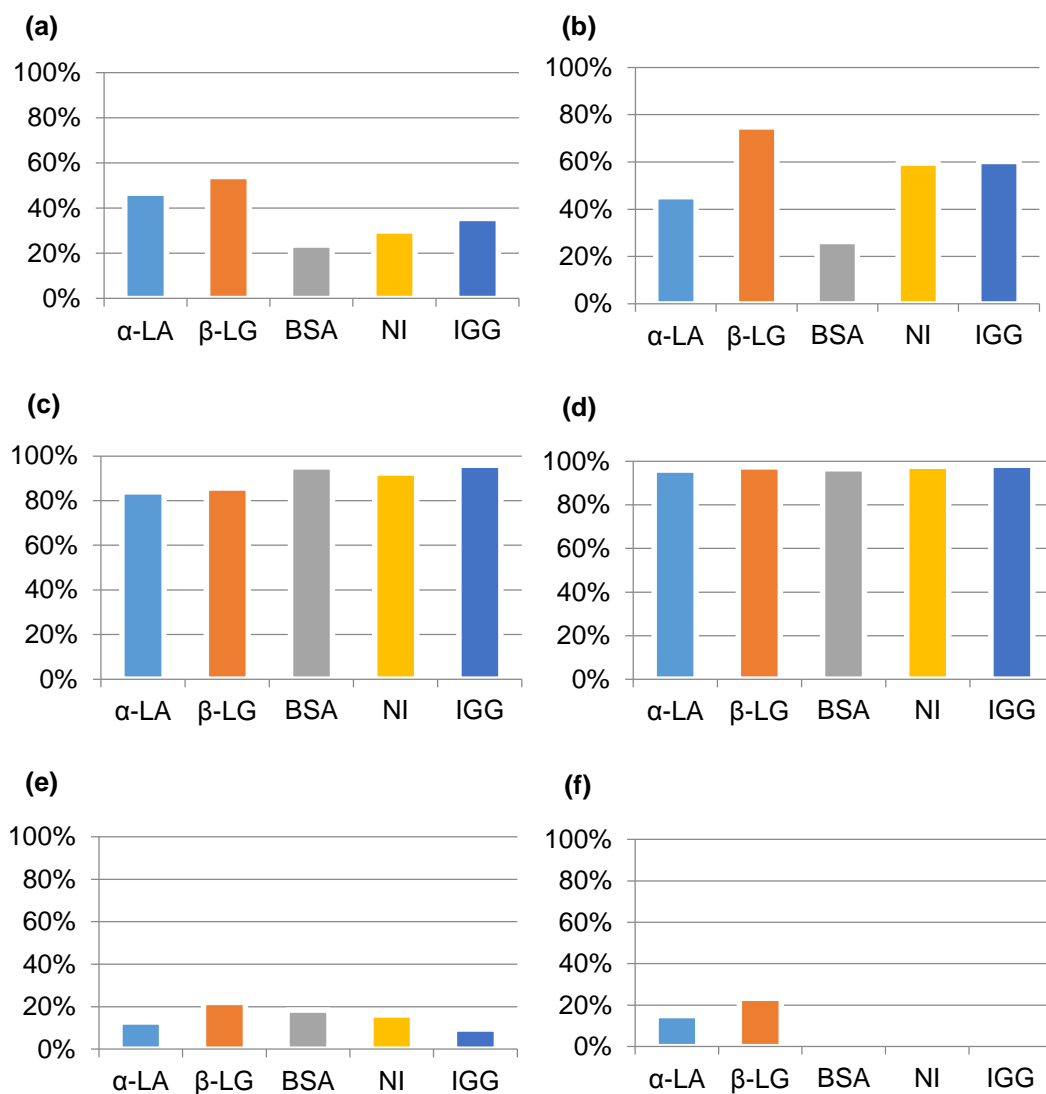
**Figura 4.27.** Normalização do rendimento de crescimento em função da razão lactose/proteína, nos conjuntos de ensaio A, B e C. (normalização em relação ao reactor de referência)



**Figura 4.28.** Normalização do rendimento de produção de VFA em função da razão lactose/proteína, nos conjuntos de ensaio A, B e C. (normalização em relação ao reactor de referência)

Os dados sugerem que a biomassa respondeu de maneira diferente, consoante o perfil de proteínas que constituem o soro de leite fraccionado. De modo que, foi necessário estudar se o sistema possuiu preferência por algum tipo de proteína ou se a diferente resposta apenas dependeu do teor proteico fornecido e da gama de tamanho que o constituem.

Verifica-se que ao final das 6 horas do processo, a biomassa consumiu todos os tipos proteína detectados no método de análise realizado, não tendo nenhuma preferência clara de um tipo de proteínas em particular (Figura 4.29).



**Figura 4.29.** Consumo percentual (base mássica) do tipo de proteína no final de 6 horas nos reactores (a) B.0, (b) C.0, (d) B.1, (d) B.2, (e) B.3 e (f) C.1.

Observou-se que a biomassa não demonstra uma preferência no tipo de proteína ao final das 30 horas, uma vez que o consumo foi de 85-100% para todos os tipos de proteínas fornecidas (Tabela 4.17).

**Tabela 4.17.** Percentagem de consumo do tipo de proteína nos ensaios B.0, B.1, B.2 e B.3, ao final de 30 horas.

Reactor	Consumo (%) t=30h $\alpha$ -LA	Consumo (%) t=30h $\beta$ -LG	Consumo (%) t=30h BSA	Consumo (%) t=30h NI	Consumo (%) t=30h IGG
B.0	88	85	100	100	100
B.1	96	96	100	100	100
B.2	100	100	100	100	100
B.3	92	100	100	100	100



---

## **5. CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS**



## 5.1 Conclusão

O trabalho desenvolvido teve como objectivo estudar o impacto da remoção parcial de proteínas, soro de leite fornecido ao processo biológico de produção de PHA, com vista à sua valorização. Teve-se especial atenção ao impacto da remoção parcial de proteínas sobre o crescimento biológico e o impacto na produção de VFA, uma vez que as proteínas fornecidas são a única fonte de azoto fornecida ao processo de fermentação acidogénica e que VFA são os produtos da fermentação e precursores da produção de PHA. Para tal, foram aplicados processos de separação com membranas com o intuito de obter fracções enriquecidas em componentes proteicas específicas.

Pelas experiências realizadas por aplicação dos processos de separação com membranas, foi possível concluir que o fraccionamento do soro do leite por ultrafiltração, a pressão transmembranar controlada, permitiu obter permeados com diferentes teores proteicos e tipologia de proteínas em relação ao soro de leite não fraccionado.

Nos ensaios realizados com uma gama de pressões entre 0,03 e 0,6 bar, sendo estas aplicadas gradualmente, numa primeira fase de forma crescente e em seguida decrescente, em membranas com 5kDa, 10 kDa, e 30kDa (M30 I), determinou-se que o fluxo crítico foi de 0,01bar, 0,02bar e 0,03bar, e o fluxo tornou-se independente da pressão a 0,6bar e 0,3bar, para as membranas de 10kDa e 30kDa.

No ensaio realizado a uma pressão transmembranar (0,03bar) igual à pressão transmembranar crítica, para a membrana de 30 kDa, o fluxo de permeado não foi prejudicado, uma vez que a permeabilidade hidráulica da membrana foi a mesma antes de depois do ensaio, e não se verificou um decréscimo do fluxo, resultado da presença de fenómenos de concentração por polarização e/ ou colmatação da membrana durante o processo, como era espectável. No entanto, o teor proteico do permeado obtido no ensaio realizado abaixo da pressão crítica (0,03bar), em comparação com o ensaio realizado à pressão transmembranar de 0,6bar (com a mesma membrana), resultou numa diminuição do teor proteico em cerca metade. Conclui-se que apesar do processo não ser afectado pelos fenómenos de colmatação da membrana e/ou concentração por polarização, o teor proteico do permeado obtido é menor, o que indica que o processo de ultrafiltração *dead-end* se devera efectuar a 0,6bar. No entanto, a realização do ensaio a uma pressão elevada terá problemas associados como maiores interrupção no processo para efectuar a limpeza, e se necessário, ao contrário do verificado nos ensaios efectuados em que a limpeza com água desionizada foi suficiente, realizar a limpeza com agentes de limpeza, o que tornará o processo mais caro e mais demorado. Uma solução a ponderar será a realização do processo com outro tipo de módulo como o módulo de *cross-flow*, de modo a diminuir a colmatação da membrana e este tipo de módulo também ajuda na própria limpeza da membrana ao longo do tempo.

A aplicação do processo de dia-ultrafiltração com uma membrana de 30 kDa (M30 II), seguido de uma osmose inversa para concentrar o permeado, permitiu aumentar a concentração do

teor proteico no permeado em 3,5 vezes, no entanto não foi alcançado um menor decréscimo do fluxo, em relação a membrana M30 I, quando realizado o ensaio nas mesmas condições.

O processo de separação com membranas de 5 e 10 kDa permitiu produzir um permeado constituído por péptidos e aminoácido. O permeado obtido com a membrana de 30 kDa além dos péptidos e aminoácidos continha as proteínas de menor tamanho molecular do soro de leite ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG), por último a membrana de 100 kDa permitiu obter toda a gama de proteínas do soro de leite na composição dos permeados. O aumento do limite de exclusão molecular permitiu a produção de fracções com composição proteica distinta, e o aumento da quantidade de teor proteico nos permeados dos processos. Os processos de ultrafiltração aplicados não retiveram lactose nem sais.

Relativamente ao ensaio de fermentação acidogénica em condições anaeróbias, nos ensaios realizados com soro de leite bruto (A.0, B.0 e C.0), verificou-se um consumo total da lactose, no entanto não foi verificado o consumo total do teor proteico fornecido, o que confirma a possibilidade de recuperação de um certo teor proteico.

O fornecimento de 60% do teor proteico do soro do leite, resultando do processo de dia-ultrafiltração com membrana de 30 kDa, foi suficiente para igualar a produção de VFA e crescimento celular do reactor de referência efectuado com soro de leite bruto. Além disso, 60% do teor proteico do soro de leite era constituído por péptidos, aminoácidos e as duas proteínas de menor tamanho do soro do leite ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG). Além dos factores mencionados, os rendimentos de produção de VFA, o rendimento de crescimento e os perfis de ácidos gordos produzidos, não foram afectados. Assim, quando foi fornecida uma fracção com 60% do teor proteico composta pelos péptidos e proteínas de menor tamanho, foi possível obter uma eficiência igual ao sistema operado com soro de leite bruto. Além disso o sistema não demonstrou preferência por um tipo de proteína.

Nos dois ensaios com razão de lactose/ proteína de 5,8 foi conseguido um rendimento de produção de VFA igual ao do ensaio de referência. Um dos permeados fornecidos era constituído por toda a tipologia das proteínas do soro de leite, resultante do ensaio com a membrana de 100 kDa, enquanto o outro continha as duas proteínas de menor tamanho do soro de leite, resultou do ensaio dia-ultrafiltração. No entanto, apenas no ensaio em que o soro fraccionado era composto por péptidos, aminoácidos e as proteínas de menor tamanho ( $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG) se conseguiu superar o rendimento de crescimento do ensaio de referência. É possível concluir que o sistema consegue ter uma melhor acessibilidade ao azoto, quando lhe é fornecido teor proteico de baixo peso molecular.

Verificou-se que apesar da diminuição do teor proteico e da diferente tipologia fornecida ao sistema, os perfis de VFA produzido não foram alterados, no caso da produção de VFA ser igualada a produção de VFA do soro de leite. Por outro lado, quando a produção de VFA não foi igualada, os perfis mantiveram se iguais, o que permite concluir que a redução total de VFA ocorre à custa de cada VFA de igual modo.

Assim, pode-se concluir que é possível recuperar as proteínas de maior tamanho para valorização do processo biológico, pela aplicação de processos de separação com membranas.

## **5.2 Trabalhos futuros**

A sugestão para futuros trabalhos inclui:

- 1) Investigar a possibilidade de efectuar os processos de separação com membranas a fluxo controlado ou realizados com fluxo tangencial (cross-flow), de modo a diminuir os efeitos da colmatção da membrana e concentração da polarização, além disso a direcção tangencial a membrana ajuda a limpeza da mesma e a menor diminuição da deposição dos solutos, o que permite uma melhor permeabilidade dos solutos,
- 2) Operar um bioreactor membrana anaeróbio (MBR) operado em contínuo, com as condições de alimentação óptimas obtidas no presente estudo.



# BIBLIOGRAFIA

- [1] M. G. E. Albuquerque, M. Eiroa, C. Torres, B. R. Nunes, and M. a M. Reis, "Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses.," *J. Biotechnol.*, vol. 130, no. 4, pp. 411–21, Jul. 2007.
- [2] L. S. Serafim, P. C. Lemos, M. G. E. Albuquerque, and M. a M. Reis, "Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 81, no. 4, pp. 615–28, Dec. 2008.
- [3] A. F. Duque, C. S. S. Oliveira, I. T. D. Carmo, A. R. Gouveia, F. Pardelha, A. M. Ramos, and M. a M. Reis, "Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition.," *N. Biotechnol.*, vol. 00, no. 00, Nov. 2013.
- [4] M. G. E. Albuquerque, V. Martino, E. Pollet, L. Avérous, and M. a M. Reis, "Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties.," *J. Biotechnol.*, vol. 151, no. 1, pp. 66–76, Jan. 2011.
- [5] S. Bengtsson, A. Werker, M. Christensson, and T. Welander, "Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater.," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 3, pp. 509–16, Mar. 2008.
- [6] W. S. Ahn, S. J. Park, and S. Y. Lee, "Production of Poly ( 3-Hydroxybutyrate ) by Fed-Batch Culture of Recombinant Escherichia coli with a Highly Concentrated Whey Solution Production of Poly ( 3-Hydroxybutyrate ) by Fed-Batch Culture of Recombinant Escherichia coli with a Highly Concentrated," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 8, pp. 3624–2627, 2000.
- [7] J. M. L. Dias, P. C. Lemos, L. S. Serafim, C. Oliveira, M. Eiroa, M. G. E. Albuquerque, A. M. Ramos, R. Oliveira, and M. a M. Reis, "Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product.," *Macromol. Biosci.*, vol. 6, no. 11, pp. 885–906, Nov. 2006.
- [8] M. G. E. Albuquerque, G. Carvalho, C. Kragelund, A. F. Silva, M. T. Barreto Crespo, M. a M. Reis, and P. H. Nielsen, "Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community.," *ISME J.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2013.
- [9] S. H. Lee, J. H. Kim, D. Mishra, Y.-Y. Ni, and Y. H. Rhee, "Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by activated sludge enriched under periodic feeding with nonanoic acid.," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 10, pp. 6159–66, May 2011.
- [10] F. Bosco and F. Chiampo, "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge production of bioplastics using dairy residues.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 109, no. 4, pp. 418–21, Apr. 2010.
- [11] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, and P. Lant, "The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 38, no. 3–4, pp. 536–583, Mar. 2013.
- [12] S. Khanna and A. K. Srivastava, "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 607–619, Feb. 2005.

- [13] C. Squio and G. Aragão, "Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias," *Quim. Nova*, vol. 27, no. 4, pp. 615–622, 2004.
- [14] L. R. Castilho, D. a Mitchell, and D. M. G. Freire, "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation.," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 23, pp. 5996–6009, Dec. 2009.
- [15] M. a M. Reis, L. S. Serafim, P. C. Lemos, a M. Ramos, F. R. Aguiar, and M. C. M. Van Loosdrecht, "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures.," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 25, no. 6, pp. 377–85, Jul. 2003.
- [16] L. S. Serafi, P. C. Lemos, M. A. M. Reis, C. Requite, F. C. T. Unl, and Q. Torre, "Produção de Bioplásticos por Culturas Microbianas Mistas," *Biotechnol. Microbiana*, pp. 16–21, 2000.
- [17] G. Chen, "Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates," *Springer*, vol. 14, pp. 17–38, 2010.
- [18] M. Reis and M. Albuquerque, "Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus / Wastes as Feedstocks," *Comprehensive Biotechnology*, vol. 1, Elsevier B.V., pp. 669–684, 2011.
- [19] T. Keshavarz and I. Roy, "Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 321–6, Jun. 2010.
- [20] M. G. E. Albuquerque, S. Concas, S. Bengtsson, and M. a M. Reis, "Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: the use of a 2-stage CSTR system for culture selection.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 18, pp. 7123–33, Sep. 2010.
- [21] P. C. Lemos, L. S. Serafim, and M. a M. Reis, "Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding.," *J. Biotechnol.*, vol. 122, no. 2, pp. 226–38, Mar. 2006.
- [22] A. R. Prazeres, F. Carvalho, and J. Rivas, "Cheese whey management: a review.," *J. Environ. Manage.*, vol. 110, pp. 48–68, Nov. 2012.
- [23] C. Mollea, L. Marmo, and F. Bosco, "Valorisation of Cheese Whey , a By-Product from the Dairy Industry," *Intech*, vol. Chapter 24, pp. 549–588, 2012.
- [24] M. I. G. Siso, "The biotechnological utilization of cheese whey: A review," *Bioresour. Technol.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–11, Jul. 1996.
- [25] W. L. S. . Blaschek, K.M; Wendorff, "Survey of Salt and Sweet whey composition from various cheese plants in Wisconsin," *J. Dairy Sci.*, vol. 80, no. 4, pp. 2029–2024, 2007.
- [26] M. R. Kosseva, P. S. Panesar, G. Kaur, and J. F. Kennedy, "Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 45, no. 5, pp. 437–47, Dec. 2009.
- [27] M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, E. Chiellini, S. Casella, P. Horvat, and G. Braunnegg, "Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters," *Intech*, vol. Chapter 2, pp. 19–60, 2012.
- [28] S. Jovanovi, M. Bara, and O. Ma, "Whey proteins-Properties and Possibility of Application," *Mljkarstvo*, vol. 55, no. 3, pp. 215–233, 2005.



- [29] R. F. I. Eça, "Péptidos bioactivos das proteínas do leite com actividade reguladora da tensão arterial," *Rev. da SPCNA*, vol. 6, no. 3, pp. 108–119, 2006.
- [30] W. C. Haraguchi, F.K; Abreu, "Proteínas do soro do leite : composição , propriedades nutricionais , aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana," *Rev. Nutr.*, vol. 19, no. 4, pp. 479–488, 2006.
- [31] A. L. Zydney, "Protein Separations Using Membrane Filtration: New Opportunities for Whey Fractionation," *Int. Dairy J.*, vol. 8, no. 3, pp. 243–250, Mar. 1998.
- [32] D. E. W. Chatterton, G. Smithers, P. Roupas, and A. Brodkorb, "Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin—Technological implications for processing," *Int. Dairy J.*, vol. 16, no. 11, pp. 1229–1240, Nov. 2006.
- [33] I. Pereira, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado, A. R. Madureira, and F. X. Malcata, "Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties," *Food Res. Int.*, vol. 10, no. 40, pp. 1197–1211, 2007.
- [34] G. W. Smithers, "Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'," *Int. Dairy J.*, vol. 18, no. 7, pp. 695–704, Jul. 2008.
- [35] V. C. Sgarbieri, "Revisão : Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite Review : Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins AUTHORS," *Brazilian J. food Technol.*, vol. 8, no. 1, pp. 43–56, 2005.
- [36] M. Butylina, Svetlana; Luque, Susana; Nystrom, "Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration," *J. Memb. Sci.*, vol. 280, no. 1–2, pp. 418–426, 2006.
- [37] Y. Chisti, "Bioseparation and Bioprocessing: a Handbook," in in *Principles of membrane separation processes*, Wiley-VCH., G. Subramanian, Ed. New York, 2007, pp. 289–322.
- [38] M. Cheryan, *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*, 2ed. ed. Pennsylvania, U.S.A.: CRC Press LLC, 1998.
- [39] R. Freen, D.; Perry, *Perry's Chemical Engineering Handbook*, 8ed ed. China: McGraww Hill, 2007.
- [40] J. H. . Richardson, F.;Haeker, *Coulson's and Richards Chemical Engineering*, 5ed ed. Inglaterra: Butterworth Heinemann, 2002.
- [41] P. Kumar, N. Sharma, R. Ranjan, S. Kumar, Z. F. Bhat, and D. K. Jeong, "Perspective of Membrane Technology in Dairy Industry: A Review," *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, vol. 26, no. 9, pp. 1347–1358, Sep. 2013.
- [42] R. Atrá, G. Vatai, E. Bekassy-Molnar, and A. Balint, "Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose," *J. Food Eng.*, vol. 67, no. 3, pp. 325–332, Apr. 2005.
- [43] A. L. Zeman, L.J; Zydney, *Microfiltration and Ultrafiltration: principles and applications*. 1996.
- [44] Y. Pouliot, M. C. Wijers, S. F. Gauthier, and L. Nadeau, "Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 158, no. 1–2, pp. 105–114, Jun. 1999.

- [45] C. Baldasso, T. C. Barros, and I. C. Tessaro, "Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration," *Desalination*, vol. 278, no. 1–3, pp. 381–386, Sep. 2011.
- [46] G. . Marshall, A.D.; Munro, P.A; Tragardh, "The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review," *Desalination*, vol. 91, pp. 65–108, 1993.
- [47] S. A. Noble, R.D; Stern, *Membrane Separation Technology - Principles and Applications*. Amsterdam: Elsevier Ltd, 1995.
- [48] M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, 2ed ed. Holanda: Kluwer Academic Publisher, 1997, p. 2.
- [49] R. I. Peinador, J. I. Calvo, P. Prádanos, L. Palacio, and A. Hernández, "Characterisation of polymeric UF membranes by liquid–liquid displacement porosimetry," *J. Memb. Sci.*, vol. 348, no. 1–2, pp. 238–244, Feb. 2010.
- [50] R. van Reis and A. Zydney, "Bioprocess membrane technology," *J. Memb. Sci.*, vol. 297, no. 1–2, pp. 16–50, Jul. 2007.
- [51] I. Angelidaki and W. Sanders, "Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants," *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology*, vol. 3, no. 2, pp. 117–129, Jun. 2004.
- [52] A. D. . eds Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E.; and Eaton, Ed., "APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," in in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th Ed., WashingtonDC: American Public Health Association//American Water Works Association/Water Environment Federation,, 1998, pp. 2– 55 – 59.
- [53] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. Farr, and R. J. Randall, "PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT," *J. Biol. Chemisry*, p. 193: 265–275, 1951.
- [54] H. Garcia, Cesar; Rogel-Hernández, Eduardo; Flores-López, Lúcia; Espinoza-gómez, "EFFECT OF THE MEMBRANE CHARACTERISTICS AND OPERATION MODES , IN THE FOULING OF ULTRAFILTRATION MEMBRANES BY NATURAL ORGANIC MATTER ( NOM )," *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 2, no. 57, pp. 1083–1086, 2012.